

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/70, 15/63, 15/12, C12P 21/02, A61K 37/02, C12N 1/21		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/29462 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. December 1994 (22.12.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/01861 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Juni 1994 (06.06.94)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: P 43 19 708.6 10. Juni 1993 (10.06.93) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BEIERS-DORF AG [DE/DE]; Unnastrasse 48, D-20253 Hamburg (DE). GBF GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; D-38124 Braunschweig (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): SCHNEPPE, Bernard [DE/DE]; Am Heller 9, D-38304 Wolfenbüttel (DE). McCARTHY, John, E., G. [GB/DE]; Zuckerbergweg 48, D-38124 Braunschweig (DE). EICHNER, Wolfram [DE/DE]; Dorotheenstrasse 49, D-22301 Hamburg (DE).			
(74) Anwalt: VOELKER, Ingeborg; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).			
(54) Title: MULTICISTRONIC EXPRESSION OF RECOMBINANT GENES IN BACTERIAL CELLS			
(54) Bezeichnung: MULTICISTRONISCHE EXPRESSION REKOMBINANTER GENE IN BAKTERIENZELLEN			
(57) Abstract			
The invention pertains to recombinant processes for producing heteromeric proteins in bacterial cells using multicistronic expression vectors. With the process as per the invention it is possible to express the components or subunits of the proteins in one and the same bacterial cell, with individual control over the rates of expression.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft rekombinante Verfahren zur Herstellung heteromerer Proteine in Bakterienzellen unter Verwendung multicistronischer Expressionsvektoren. Mit Hilfe des erfundungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, die Komponenten oder Untereinheiten der Proteine in ein und derselben Bakterienzelle zu exprimieren, wobei die Expressionsrate individuell steuerbar ist.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Moogolei	VN	Vietnam

MULTICISTRONISCHE EXPRESSION REKOMBINANTER
GENE IN BAKTERIENZELLEN

Die Erfindung betrifft die rekombinante Herstellung heteromerer Proteine in Bakterienzellen unter Verwendung multicistronischer Expressionsvektoren.

Eine wichtige allgemeine Strategie zur Erzeugung und Isolierung relativ großer Mengen eines rekombinanten Proteins wie beispielsweise eines Wachstumsfaktors ist die Überexpression der cDNA mit Hilfe entsprechender Expressionssysteme. Zur heterologen Genexpression werden verschiedene Systeme eingesetzt, u.a. Säugerzellen, das Baculovirussystem in Insektenzellen, Hefe, oder Bakterien wie *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. Obwohl jedes dieser Systeme Vor- und Nachteile aufweist, wird weitaus am häufigsten mit dem Bakterium *E. coli* gearbeitet. Dieser Organismus bietet gute Voraussetzungen für die Entwicklung von Strategien zur Überproduktion fremder Gene, da er einerseits gentechnologisch leicht und ökonomisch günstig zu handhaben und andererseits im Vergleich zu allen anderen Systemen am umfassendsten erforscht ist. So existieren definierte Stämme

- z.T. mit für die heterologe Genexpression günstigen Mutationen - und Vektorsysteme mit gut charakterisierten effektiven Steuerungselementen, die relativ einfach und schnell hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein sowohl für akademische als auch 5 für kommerzielle Zwecke ermöglichen.

Die Höhe der Ausbeute an rekombinantem Protein kann durch mehrere Faktoren gesteuert bzw. beeinflußt werden (Buell und Panayotatos, 1986; Glick und Whitney, 1987; Gold, 1990; McCarthy, 10 1991). Die in erster Linie Ausbeute-bestimmenden Kriterien für die heterologe Genexpression in *E. coli* sind jedoch die Effizienz der Transkription und der Translation eines Gens. Die Steuerung dieser Prozesse muß daher bei der Entwicklung bzw. Verwendung eines Expressionssystems beachtet werden. Um die 15 effektive Transkription eines Gens zu gewährleisten, wird dieses im allgemeinen unter die Kontrolle eines "starken" Promotors gebracht. Damit die Fremdgenexpression nicht unnötig mit dem Metabolismus der Zelle interagiert und möglicherweise den Zellertrag oder die Plasmidstabilität herabsetzt, sollte der Promotor 20 regulierbar, d. h. in einer bestimmten Wachstumsphase der Zellen aktivierbar sein. Die gebräuchlichsten Promotoren sind die des trp- oder lac-Operons von *E. coli*, der tac-Promotor, die Promotoren P_L und P_R des Bakteriophagen Lambda und der Promotor des Bakteriophagen T7 (Yansura und Henner, 1990; Yanisch-Perron 25 et al., 1985; Stark, 1987; de Boer et al., 1983; Remaut et al., 1981; Schauder et al., 1987; Tabor und Richardson, 1985; Studier und Moffatt, 1986).

Die Translationsrate eines Gens wird in *E. coli* in erster Linie 30 auf der Stufe der Initiation über die Translations-Initiations-Region (TIR) des Gens gesteuert. Dieser Bereich der mRNA ist funktionell definiert und legt sowohl den Ort als auch die Effizienz der Initiation der Translation fest. Er umfaßt neben der Shine/Dalgarno-Sequenz und einem hiervon im Abstand von 4-12 35 Basen gelegenen Startcodon auch weitere flankierende Bereiche der mRNA, die die Effizienz der Ribosomenbindung über ihre Primärsequenzen und Strukturen höherer Ordnung beeinflussen können

(siehe unten). Während der 5' Bereich der TIR eines Gens einen nicht translatierten "leader" oder im Falle einer polycistronischen mRNA auch das Ende eines stromaufwärts gelegenen Cistrons beinhalten kann, kann der 3' Bereich bis in den zugehörigen 5 kodierenden Genabschnitt selbst hineinreichen (McCarthy, 1991; McCarthy und Gualerzi, 1990; vergleiche Scherer et al., 1980).

Zur Gewährleistung der effektiven Translation eines rekombinanten Gens in *E. coli* existieren prinzipiell drei Strategien. Eine 10 Möglichkeit besteht in der Expression des rekombinanten Gens als Teil eines Fusionsgens (Uhlen und Moks, 1990; Yansura, 1990). Dazu wird es unter Beibehaltung des Leserahmens stromabwärts der TIR und des 5' Bereiches eines gut exprimierbaren prokaryontischen Gens kloniert. Diese Konstruktion wird auch als transla- 15 tionelle Fusion bezeichnet. Da die TIR nicht verändert wird, kann in der Regel auch für das Fusionsgen von einer vergleichbar hohen Translationsrate ausgegangen werden. Mit Hilfe dieser Methode wurde zum ersten Mal gezeigt, daß Bakterien in der Lage sind, eukaryontische kodierende Sequenzen zu exprimieren (Villa- 20 Komaroff et al., 1978; Seeburg et al., 1978; Martial et al., 1979). Sie ist von besonderer Bedeutung für die Herstellung von Antigenen und Vaccinen, wobei die Fusionsproteine direkt eingesetzt werden können (Kleid et al., 1981; Ellis et al., 1983; Van der Werf et al., 1983; Stanley und Luzio, 1984; Jacob et al., 25 1985; Cabradilla et al., 1986; Nilson und Abrahmsen, 1990), und für die stabile Synthese sehr kleiner Polypeptide oder Proteine in *E. coli*, da letztere als Teil eines Fusionsproteins vor proteolytischem Abbau durch bakterielle Proteasen geschützt werden können (Itakura et al., 1977; Shine et al., 1980; Ohsuye et al., 30 1983; Stanley und Luzio, 1984; Wingender et al., 1988; Yansura, 1990; Nilsson und Abrahmsen, 1990). Dabei spielt auch die in vielen Fällen beobachtete Aggregation der Fusionsproteine in Form von Einschlußkörpern eine Rolle (Marston et al., 1986; Kane and Hartley, 1988). Der N-terminale Proteinanteil kann außerdem 35 so gewählt werden, daß die Aufreinigung des Fusionsproteins erleichtert wird (Ullman, 1984; Germino und Bastia, 1984; Brewer und Sassenfeld, 1985; Moks et al., 1987; Nilsson und Abrahmsen,

1990). Als Fusionsprotein im Cytoplasma exprimierte rekombinante Gene können bis zu 20% des gesamten Zellproteins ausmachen (Marston, 1986).

5 Der große Nachteil dieser Strategie ist jedoch, daß das nicht fusionierte rekombinante Protein erst nach der Entfernung des N-terminalen prokaryontischen Fusionsproteinanteils, der die biologische Aktivität des Proteins verringern kann und dessen antigene Eigenschaften verändert, erhalten werden kann. Die häufig 10 zu diesem Zweck angewandte chemische Spaltung des Fusionsproteins mit dem Reagenz Cyanbromid, welches nach Methioninresten in der Proteinkette angreift, ist beschränkt auf Polypeptide, die keine internen Methioninreste tragen und säurestabil sind, da die Spaltung in 70% Ameisensäure durchgeführt wird (Itakura 15 et al., 1977; Goeddel et al., 1979; Ohsuye et al., 1983; Peters et al., 1985; Marston, 1986; Hoppe et al., 1989, 1990). Eine Spaltung von Fusionsproteinen durch Säure- (Szoka et al., 1986; Wingender et al., 1989) oder Hydroxylaminbehandlung (Moks et al., 1987) zwischen den entsprechend eingebauten Aminosäuren 20 Asparaginsäure und Prolin bzw. Asparagin und Glycin kann einerseits wiederum nur für rekombinante Genprodukte eingesetzt werden, die diese Kombination nicht aufweisen. Andererseits können bei diesen Methoden modifizierte Proteine entstehen, die gegenüber dem natürlich vorkommenden eine zusätzliche oder andere 25 Aminosäure am N-terminalen Ende tragen (Szoka et al., 1986; Wingender et al., 1989) und im Falle der Säurebehandlung Asparaginreste, die die Amidgruppe verloren haben (Marston, 1986). Eine zusätzliche Aminosäure am N-Terminus oder deren Austausch gegen eine andere kann die Aktivität des rekombinanten Proteins 30 beeinflussen (Potts et al., 1982; vergleiche Szoka et al., 1986) oder kann dessen antigene Eigenschaften derart verändern, daß es für eine möglicherweise geplante klinische Anwendung nicht geeignet ist. In anderen Fällen wurden zwischen prokaryontischem und rekombinantem Fusionsgenanteil Sequenzen eingebaut, die für 35 spezifische Protease-Spaltstellen kodieren, sodaß durch enzymatische Spaltungen das natürliche rekombinante Protein wieder hergestellt werden konnte (Lee und Ullrich, 1984; Nagai und

Thogersen, 1984; Germino und Bastia, 1984; Vardarajan et al., 1985; Nambiar et al., 1987; Brewer und Sassenfeld, 1985; Nilsson und Abrahmsen, 1990). Aber auch bei diesem Ansatz können Schwierigkeiten auftreten, wenn innerhalb des Fremdproteins protease-
5 sensitive Bereiche enthalten sind (Shine et al., 1980; vergleiche Nambiar et al., 1987), das Fusionsprotein unter Bedingungen, die für die Aktivität der Proteasen notwendig sind, nicht löslich ist, oder die eingebaute Protease-Spaltstelle durch andere Proteinbereiche vor dem Protease-Angriff abgeschirmt wird (Mar-
10 ston, 1986; Wingender et al., 1989). Weiterhin wird die Bedeutung der Fusionsgenmethode für die Herstellung rekombinanter Proteine im großtechnischen Maßstab durch die Toxizität von Cyanbromid einerseits und die anfallenden Kosten für Proteasen andererseits gemindert.

15

Eine Abwandlung der oben angesprochenen Methode ist die Synthese rekombinanter Proteine fusioniert mit sogenannten bakteriellen Signalpeptidsequenzen (Marston, 1986; Nicaud et al., 1986; Stader und Silhavy, 1990). Diese Sequenzen vermitteln den Transport
20 von Proteinen aus dem Cytoplasma in den periplasmatischen Raum von *E. coli* oder in selteneren Fällen auch in das Kulturmedium. Da das Signalpeptid aber während des Transports über die Cytoplasmamembran abgespalten wird, kann mit Hilfe dieser Methode bei entsprechend durchgeföhrter Fusion direkt das authentische
25 rekombinante Protein erhalten werden. Die Lokalisation des Proteins im Periplasma von *E. coli* oder im Kulturmedium kann dessen anschließende Aufreinigung erleichtern und, obwohl auch Gegen- teiliges bekannt ist (Gentz et al. 1988; Strauch und Beckwith, 1988), vor proteolytischem Abbau schützen (Talmadge und Gilbert,
30 1982; Swamy und Goldberg, 1982; Wong et al., 1988; Dalboge et al., 1989).

Mittlerweile gibt es eine Anzahl von Beispielen für die erfolgreiche Nutzung dieser Methode. Während die Sekretion rekombinanter Proteine ins Kulturmedium nur in wenigen Fällen gelang (Nagahari et al., 1985; Lord, 1985), wurde in der Mehrzahl der Arbeiten unter Verwendung verschiedener bakterieller Signalpep-

tidsequenzen der Export rekombinanter Proteine ins Periplasma von *E. coli* beschrieben (Talmadge et al., 1980; Zemel-Dreason und Zamir, 1984; Chang et al., 1987; Dalboge et al., 1989). Einige Arbeitsgruppen beobachteten passives Herauslecken des 5 Proteins aus dem Periplasma (Wong et al., 1988; Obukowicz et al. 1988; Better et al., 1988, vergleiche Stader und Silhavy, 1990) oder erreichten dessen Freisetzung durch die Coexpression weiterer Gene, deren Produkte die äußere Membran von *E. coli* permeabel machten (Kato et al., 1987; Hsiung et al., 1989). In diesem 10 Zusammenhang zeigt sich ein weiterer Vorteil des Exports rekombinanter Proteine in den periplasmatischen Raum von *E. coli*. Da in diesem Kompartiment stärker oxidierende Bedingungen herrschen als im Cytoplasma, können hier Proteine mit Disulfidbrücken solche Bindungen ausbilden und damit ihre korrekte Konformation 15 erlangen (Chan et al., 1981; Pollitt und Zalkin, 1983; Emerick et al., 1985; Gray et al., 1985; Hsiung et al., 1986; Kato et al., 1987; Wong et al., 1988; Hsiung et al., 1989; Klein et al., 1991). In den zitierten Arbeiten wurden die Signalpeptidsequenzen jeweils korrekt prozessiert, die resultierenden rekombinan- 20 ten Proteine waren löslich und, wenn untersucht, biologisch aktiv. Es wurden allerdings auch schon unlösliche Proteinaggregate im Periplasma gefunden (Takagi et al., 1988; Wong et al., 1988; Obukowicz et al., 1988). In Ausnahmefällen wurde auch für eukaryontische Proteine mit deren natürlichen Signalsequenzen 25 die korrekte Prozessierung in *E. coli*-Zellen und der Transport in das Periplasma nachgewiesen (Talmadge et al., 1980; Zemel-Dreasen und Zamir, 1984; Gray et al., 1985).

Mit der Herstellung biologisch aktiver Antikörper-Fragmente 30 wurde gezeigt, daß auch aus verschiedenen Untereinheiten bestehende rekombinante Proteine im Periplasma korrekt assembliert werden können (Better et al., 1988; Skerra und Plückthun, 1991; Sawyer und Blattner, 1991). Die weitere Dimerisierung von Fab- zu F(ab)₂-Fragmenten scheiterte jedoch (Carter et al., 1992).

35

Leider ließ sich bis heute aus den vorliegenden Ergebnissen keine universell einsetzbare Standardmethode bezüglich des Ex-

ports oder der Sekretion rekombinanter Proteine durch *E. coli* ableiten. Im Gegenteil scheint jedes Protein einen Spezialfall zu repräsentieren, da die Anwesenheit von Signalpeptiden zwar die Voraussetzung für den Transport über die Cytoplasmamembran 5 ist, aber auch weitere Informationen aus den Sequenzbereichen des reifen Proteins dazu notwendig sind. So erwies sich in einigen Fällen die Synthese Signalpeptid tragender Proteine als toxisch für *E. coli*, weil die chimären Proteine in der Cytoplasmamembran stecken blieben und die Exportmaschinerie blockiert 10 wurde (Bassford et al., 1979; Ito, 1981; Henning et al., 1983; Brosius, 1984). Weiterhin wurde erst in einem Fall der Export eines eukaryontischen cytoplasmatischen Proteins in das Periplasma von *E. coli* publiziert (Takahara et al., 1988). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß nicht jedes Protein 15 exportierbar ist. Andere Arbeiten zeigten darüberhinaus, daß die Exportmaschinerie von *E. coli* nur eine begrenzte Kapazität besitzt, die lediglich eine moderate Syntheserate für das rekombinante Protein zuläßt (Obukowicz et al., 1988). Eine Steigerung der Rate hatte jeweils eine Anhäufung des unprozessierten Vor- 20 läuferproteins im Cytoplasma und eine Hemmung des Zellwachstums zur Folge (Hsiung et al., 1986; Hsiung et al., 1989; Takagi et al., 1988; Klein et al., 1991). Diese Tatsache bietet eine Erklärung für einen weiteren gravierenden Nachteil dieser Expressionsmethode, welcher darin begründet ist, daß bisher mit Aus- 25 nahme von Kato et al. (1987) (11,2 mg/Liter Kultur) im Vergleich zur cytoplasmatischen Expression nur sehr geringe Ausbeuten an rekombinantem Protein erzielt werden konnten (bis ca. 7% des gesamten Zellproteins bzw. ca 1-2 mg/Liter Kultur). Für kleine Proteine kann der Export ins Periplasma allerdings auch sehr 30 effektiv sein (Dalboge et al., 1989). Der von Carter et al. (1992) publizierte Wert von 1-2 g Fab-Fragmenten pro Liter Kultur wurde allerdings nur durch ein spezielles Hochzelldichte-Fermentationsverfahren erreicht. Der Export von rekombinantem Protein ins Periplasma oder dessen Sekretion ins Kulturmöedium 35 wurde in neueren Expressionssystemen durch die Verwendung der N-terminalen *Staphylococcus* Protein A-Sequenz zwar deutlich effektiver gestaltet (Nilsson und Abrahson, 1990). Bei den auf diese

Weise erhaltenen Produkten handelt es sich jedoch jeweils wiederum um Fusionsproteine (vergleiche mit oben).

Die dritte prinzipielle Methode zur heterologen Genexpression in 5 *E. coli*, die direkte cytoplasmatische Expression, zielt auf die Synthese nicht fusionierter ausschließlich durch das rekombinante Gen kodierter Proteine im Cytoplasma ab (McCarthy, 1991). Um das rekombinante Gen zu diesem Zweck mit einem effektiven bakteriellen Translationssteuerungssignal zu versehen, wird es im 10 allgemeinen mit einem Startcodon in optimaler Entfernung an die nicht translatierte 5' -"leader"-Sequenz einer effektiven bakteriellen TIR angeschlossen. Derjenige Bereich einer TIR (s.o.), der nicht den codogenen 5'-Bereich des jeweiligen Cistrons einschließt, wird in dieser Anmeldung allgemein als Translations- 15 Initiations Sequenz (TIS) bezeichnet. Diese Konstruktion, die auch als transkriptionelle Fusion bezeichnet wird, resultiert in einer neuen chimären TIR bestehend aus dem bakteriellen "leader" inklusive Shine/Dalgarno-Sequenz (TIS) und dem 5' Bereich des rekombinanten Gens. Die Notwendigkeit eines Startcodons am 5' 20 Ende der rekombinanten Gensequenz für die Initiation der Translation hat bei dieser Methode den Nachteil, daß das Erstprodukt des Translationsprozesses jeweils einen Methioninrest als N-Terminus trägt. Dieser wird vielfach abgespalten, sodaß bei geeignetem Anschluß der Gensequenz an den bakteriellen "leader" 25 das gewünschte authentische rekombinante Genprodukt erhalten wird (George et al., 1985; Winkler et al., 1985; Kronheim et al., 1986; Langley et al., 1987A; Tanizawa et al., 1987; Meyers et al., 1987). Demgegenüber steht eine Reihe von rekombinanten Genprodukten, bei denen diese Abspaltung nicht beobachtet wurde 30 (Goeddel et al., 1979; Ikehara et al., 1984; Buell et al., 1984; Kaytes et al., 1986; Ivanoff et al., 1986; Miki et al., 1987; Denefle et al., 1987; Saito et al., 1987).

Ein weiterer Nachteil dieser Expressionsmethode kann im Angriff 35 des Expressionsproduktes durch cytoplasmatische Proteasen bestehen. Die Synthese Protease-sensitiver rekombinanter Genprodukte im Cytoplasma kann aber durch die Verwendung spezieller *E.*

coli-Stämme, die Defekte im htpR-Gen oder in Proteasegenen tragen, erreicht werden (Boss et al., 1984; Buell et al., 1985; Mandecki et al., 1986). Außerdem wurde die Stabilisierung rekombinanter Proteine durch die Coexpression von Genen erreicht, die 5 ein Produkt kodieren, das Fremdproteine schützt (Simon et al., 1983; Duvoisin et al., 1986) oder dieses in unlösliche Aggregate präzipitiert (Saito et al., 1987). In letzterem Fall wurde ein bicistronisches System bestehend aus zwei überlappenden Genen eingesetzt, das zu einem molaren Verhältnis der Genprodukte von 10 4,5 : 1 führte.

Beispiele für bekannte natürliche "leader"-Sequenzen bakterieller TIRs bzw. TISs, welche für die Initiation der Translation rekombinanter Gene in *E. coli* verwendet wurden, wird die des 15 lacZ-Gens aus *E. coli* (Taniguchi et al., 1980; de Boer et al., 1983), des Replicase-Gens des RNA-Phagen MS2 (Remaut et al., 1983; Sollazzo et al., 1985), des lpp-Gens aus *E. coli* (Nakamura und Inouye, 1982), des atpE-Gens aus *E. coli* (McCarthy et al., 1985; Schauder et al., 1987; Belev et al., 1991), des cro-Gens 20 des Phagen Lambda (Sollazzo et al., 1985) und des Gens10 des Phagen T7 (Studier et al., 1990; Ollins und Rangwala, 1990). Ferner wurden synthetische "leader" verwendet (Jay et al., 1981; Crowl et al., 1985; Stanssens et al., 1985). Die chimäre TIR sollte eine relativ offene Konformation aufweisen, um die effektive Bindung von Ribosomen zu erlauben. Sollte die TIR jedoch in 25 Sekundärstrukturen der mRNA eingebettet sein, so kann durch in vitro-Mutagenese oder durch die Verwendung anderer, auch in vitro synthetisierter oder modifizierter, bakterieller "leader"-Sequenzen deren Stabilität verringert und die Genexpression 30 damit deutlich gesteigert werden (Buell et al., 1985; Stanssens et al., 1985; Lee et al., 1987; Schauder und McCarthy, 1989; Spanjaard et al., 1989; Gross et al., 1990; McCarthy, 1991). Zur Vereinfachung solcher Optimierungen existieren besondere Expressionsvektoren, die auch als Einzelstrang-DNA zur Durchführung 35 der in vitro-Mutagenese isoliert werden können (Solazzo et al., 1985; Belev et al., 1991) oder in denen bakterielle "leader" als Cassetten ausgetauscht werden können (Schauder et al., 1987;

Belev et al., 1991). In einer anderen Strategie wurde die Aktivierung durch Strukturen höherer Ordnung maskierter TIRs rekombinanter Gene über translationelle Kopplung erreicht (Schoner et al., 1984; Spanjaard et al., 1989). Die Sekundärstrukturen der 5 TIRs wurden dabei durch elongierende Ribosomen geöffnet, die entsprechend stromaufwärts der rekombinanten Gene plazierte kurze Präcistrons translatieren.

Direkt exprimierte rekombinante Genprodukte können bis zu ca. 10 20-30% des gesamten Zellproteins von *E. coli* ausmachen. In vielen Fällen wurde die Aggregation der Proteine in Form von Einschlußkörpern im Cytoplasma beobachtet (s. Übersichtsartikel von Marston, 1986; Kane und Hartley, 1988). Die Bildung dieser unlöslichen Aggregate kann aus mehreren Gründen vorteilhaft sein. 15 Die Isolierung der Einschlußkörper mit dem rekombinanten Protein ist einfach und resultiert bereits in einem Produkt von mehr als 50% Reinheit. Das ermöglicht eine Zeit und Kosten sparende Aufreinigungsprozedur, da im allgemeinen durch lediglich einen weiteren Schritt zu mehr als 90% reine Proteinpräparationen 20 gewonnen werden können. Weiterhin bietet die Aggregation von Fremdprotein in *E. coli*-Zellen Schutz vor Proteasen (Saito et al., 1987), was den Vorteil homogener Proteinpräparationen bietet, da proteolytische Spaltprodukte oft schwierig zu entfernen sind. Das Problem ist jedoch, die unlöslichen und biologisch 25 inaktiven Proteine wieder zu solubilisieren und in ihre native und aktive Form zu überführen. Die erfolgreiche Renaturierung ist allerdings mittlerweile für eine Vielzahl rekombinanter Proteine beschrieben (Boss et al., 1984; Cabilly et al., 1984; Marston et al., 1984; Simons et al., 1984; Gill et al., 1985; 30 George et al., 1985; Winkler et al., 1985; Zurawski et al., 1986; Kronheim et al., 1986; Tsuge et al., 1987; Langley et al., 1987B; Deneffle et al., 1987).

Andere rekombinante Proteine ließen sich im Cytoplasma in löslicher Form mit hoher Rate direkt exprimieren (Pennica et al., 35 1985; Gross et al., 1985; Kishimoto et al., 1986; Meyers et al., 1987; Tanizawa et al., 1987; Levi et al., 1987). Die Produkte

waren zwar biologisch aktiv, jedoch war meistens eine aufwendige Prozedur zu deren Aufreinigung erforderlich. Der Anteil an löslichem rekombinantem Protein wird stark durch die Inkubationsstemperatur der rekombinanten Zellen beeinflußt (Schein, 1989).

5

In der Regel wurden bisher im Cytoplasma von *E. coli* oder anderen Bakterien rekombinante Proteine stets einzeln exprimiert (vergleiche oben). Aber insbesondere in Fällen, in denen eine *in vitro* Dimerisierung verschiedener Proteinketten oder der Einbau 10 verschiedener Proteinuntereinheiten in Komplexe angestrebt wird, wären auch Systeme wünschenswert, die die Coexpression von Proteinen in einer Zelle erlauben.

Für eine Multimerisierung von Proteinen, die die Ausbildung von 15 Disulfidbrücken erfordert, direkt im bakteriellen Cytoplasma erweisen sich allerdings die dort herrschenden reduzierenden Bedingungen (Kane und Hartley, 1988; Tugge und Fuchs, 1985; vergleiche oben) oftmals als großes Problem. Dieses wird besonders deutlich bei der Synthese von Antikörperfragmenten in *E. coli*. Während bei der cytoplasmatischen Coexpression von Genen 20 für schwere und leichte Antikörperketten keine aktiven d.h. korrekt assemblierten Antikörperfragmente erhalten wurden (Cabbilly et al., 1984; Boss et al., 1984), konnte durch die Sekretion der Ketten ins Periplasma das Problem gelöst und funktionelle Produkte erzielt werden (Better et al., 1988; Skerra und Plückthun, 1991; Sawyer und Blattner, 1991). In letzteren Arbeiten 25 wurden die Gene der Antikörper-Domänen mit Sequenzen, die für bakterielle Signalpeptide kodieren, fusioniert und in Form einer bicistronischen mRNA von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert. Die Fusion von zwei rekombinanten Genen mit den 30 gleichen Signalsequenzen inklusive Ribosomen-Bindestelle führte zu identischen und nichtmodifizierten bakteriellen TIR-Sequenzen zur Steuerung der Translationsrate beider Gene (Better et al., 1988; Sawyer und Blattner, 1991; Carter et al., 1992). Das stöchiometrische Verhältnis der Genprodukte wurde in keinem Falle 35 überprüft oder gar versucht, dieses über die Variation der TIR- bzw. TIS-Sequenzen auf der Stufe der Initiation der Translation

zu beeinflussen. Im Falle der cytoplasmatischen Expression von Immunglobulinfragmenten wurde die Coexpression mit Hilfe zweier verschiedener Plasmide erreicht (Cabilly et al., 1984; Boss et al., 1984). Bei dieser Methode ist es nicht möglich - vielleicht 5 auch nicht gewünscht - , die Syntheseraten der rekombinannten Proteine aufeinander abzustimmen, und es wurden daher unterschiedliche Ausbeuten an schweren und leichten Antikörperketten erhalten. Dabei spielte auch differentielle Plasmidstabilität eine Rolle (Boss et al., 1984).

10

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die gebräuchlichen und hier diskutierten Strategien zur heterologen Genexpression in *E. coli* letztlich zwei übergeordneten grundsätzlichen Kategorien zuzuordnen sind. In einem Fall wird durch die Sekretion der 15 Proteinuntereinheiten in das Periplasma versucht, biologisch aktives Protein zu erhalten. Da diese Strategie nicht universell anwendbar ist und zumeist nur limitierte Produktausbeuten zuläßt, wird daher für die Produktion von Proteinen im biotechnologischen Maßstab in der Regel die cytoplasmatische Expression 20 bevorzugt. Für die Gewinnung von Heteromeren wurden bisher entweder verschiedene *E. coli*-Stämme oder verschiedene Plasmide in einem Stamm verwendet. Die multicistronische Expression signal-peptidfreier, für Fremdproteine kodierender Gene in Bakterienzellen ist bisher im Stand der Technik nicht bekannt. Insbesondere 25 ist es nicht möglich, die Expressionsrate der jeweiligen Komponenten der Heteromere zu steuern.

Eine derartige Steuerung der Syntheseraten cytoplasmatisch coexprimierter Untereinheiten heteromerer Proteine ist jedoch von 30 großem wirtschaftlichen Interesse. So ist es sinnvoll, die Syntheserate den stöchiometrischen Verhältnissen gemäß einzustellen, die für eine nachfolgende *in vitro* Dimerisierung (also beispielsweise 1:1) oder den Zusammenbau zu einem Multi-Untereinheiten-Proteinkomplex günstig oder notwendig sind, wenn die 35 Proteinmonomere unter Schaffung oder Beibehaltung dieses Verhältnisses in nativer oder denaturierter Form zusammen isoliert und/oder zum Multimer rekonstituiert werden können. Unterschiede

im Löslichkeitsverhalten oder selektive Ausbeuteverluste, die für die von den verschiedenen Cistrons codierten Proteinuntereinheiten im Verlauf des jeweiligen Proteinreinigungsverfahrens auftreten, können maßgeblichen Einfluß auf die Einstellung der 5 relativen Syntheseraten haben. So ist es beispielsweise von Vorteil, ein für die Heterodimerisierung scheinbar optimales stöchiometrisches Expressionsverhältnis der Untereinheiten von 1:1 dahingehend zu verändern, daß die Proteinuntereinheit mit geringerer Löslichkeit oder den höchsten relativen Ausbeuteverlusten bei der Reinigung durch Hochregulation der Translationseffizienz am korrespondierenden Cistron in der Menge den jeweiligen Anforderungen angepaßt wird. Umgekehrt kommt auch eine negative Regulation des besser exprimierten Cistrons in Betracht.

15

Die Steuerung der Syntheseraten ist für die bereits diskutierten Antikörper-Komponenten sowie unter anderem für heteromere Proteine wie VEGF, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder der TGF- β Superfamilie, Bone Morphogenic Protein (BMP), Faktoren der Integrin/Cadherin Familie, Histokompatibilitätsantigene, Hämoglobin, T-Zell Rezeptoren oder das AB-Heterodimer des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) bzw. deren natürliche oder synthetische Varianten interessant.

25 Der Wachstumsfaktor aus Blutplättchen (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) ist ein hochaktives Mitogen für Zellen mesenchymalen Ursprungs sowie glattmuskuläre Zellen (Kohler und Lipton, 1974; Ross et al., 1974). Schon sehr frühzeitig wurde vermutet, daß PDGF *in vivo* maßgeblich an lokalen Wundheilungsprozessen 30 beteiligt ist (Ross et al. 1974; Deuel & Huang, 1984). Die Hypothese wird durch aktuelle klinische Befunde (Mustoe et al., 1989; Pierce et al., 1989; Greenhalgh et al., 1990, Pierce et al., 1991A, 1991B; Robson et al., 1992) erhärtet.

35 Aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigtes PDGF besteht aus zwei unterschiedlichen, aber nahe verwandten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Unter

reduzierenden Bedingungen zerfällt das dimere PDGF in seine monomeren, biologisch inaktiven Untereinheiten, wovon die größere (M_r 15-17.000 D) als PDGF-A-Kette und die kleinere (M_r 14.000 D) als PDGF-B-Kette bezeichnet wurde (Johnsson et al., 1984).

5

Die Proteinketten PDGF-A und -B werden von verschiedenen Genen kodiert. Die vollständige Struktur beider Genprodukte konnte durch cDNA-Klonierung aufgeklärt werden (Ratner et al., 1985, Betsholtz et al., 1986). Dabei ergab sich, daß beide PDGF-Moleküle zunächst als ungewöhnlich lange Vorläufermoleküle, sog. precursoren, synthetisiert und anschließend intrazellulär zu den reifen PDGF-Ketten prozessiert werden. Durch alternatives Splicing lassen sich zwei verschiedene PDGF-A-Transkripte erklären, die sich durch An- oder Abwesenheit eines 69-bp Segmentes im 3'-15 Bereich erklären (Betsholtz et al., 1986; Wise et al., 1989). Durch dieses Insert kommt es zu einer Änderung im codierenden Abschnitt mit der Folge, daß eine kurze (PDGF-A_K, 110 Aminosäuren) und eine lange (PDGF-A_L, 125 Aminosäuren) Form der PDGF-A-Kette gebildet wird. Beide Varianten sind als normale zelluläre 20 Proteine nebeneinander nachweisbar, wobei die kürzere Form die häufigere Spezies ist (Matoskova et al., 1989; Young et al., 1990). Die höhere Affinität zum PDGF- α -Rezeptor könnte der Grund für die stärkere mitogene Potenz von PDGF-A_K gegenüber PDGF-A_L sein.

25

Beide Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen hohen Homologiegrad. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, daß beide Gene unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine Folge davon ist, daß beide PDGF-Ketten von 30 verschiedenen Zelltypen normalerweise in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander produziert werden.

Alle drei möglichen Isoformen des PDGF (AA, AB und BB) kommen natürlicherweise vor und sind in Thrombozyten in sog. α -Granula gespeichert. Aus überlagerten menschlichen Blutplättchen kann neben dem die Hauptmenge ausmachenden PDGF-AB Heterodimer auch PDGF-BB zu etwa 30% isoliert werden (Hammacher et al., 1988).

Frisch präparierte Blutplättchen enthalten auch einen hohen Anteil (27%) an PDGF-AA (Hart et al., 1990). Es kann daher angenommen werden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, die PDGF-Isoformen AA, AB und BB im statischen 5 1:2:1-Verhältnis zueinander hergestellt werden und daß daher der Anteil beider Homodimere etwa dem AB-Heterodimer-Anteil entspricht. Die Konzentration jeder PDGF-Spezies im Thrombozyten sollte direkt korrelieren mit ihrer individuellen Bedeutung im Wundheilungsgeschehen, wodurch insbesondere das PDGF-AB 10 eine herausragende Rolle auf der Suche nach einem "Wundheilungshormon" bekommt.

Die geringen Ausbeuten bekannter Reinigungsprotokolle sind ein Grund dafür, daß es außerordentlich problematisch ist, PDGF in 15 nennenswerten Mengen aus natürlichen Quellen zu isolieren. Noch weit weniger aussichtsreich ist es zu versuchen, die im humanen Thrombozyten-PDGF enthalten Isoformen (PDGF-AA, -AB, -BB; Hamacher et al., 1988) getrennt zu isolieren. Alle verschiedenen Isoformen besitzen biologische Aktivität *in vitro*. Erst die 20 Verfügbarkeit der hochreinen, rekombinannten PDGF-Isoformen (Hoppe et al., 1989; Hoppe et al., 1990) machte vergleichende Studien zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen PDGF-Spezies möglich. Mittlerweile belegen eine Reihe von Untersuchungen die unterschiedliche Potenz von 25 PDGF-AA, AB und BB im Chemotaxis- und DNA-Proliferationstest (Hosang et al., 1989; Nister et al., 1988; Reilly & Broski, 1989; Siegbahn et al., 1990), sowie deren unterschiedlichen Einfluß auf die Freisetzung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat, Produktion von Diacylglycerol und $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung (Block et 30 al., 1989; Sachinidis et al., 1990A; Sachinidis et al., 1990B). Zwei unterschiedliche PDGF-Rezeptorpopulationen, von denen der PDGF- α -Rezeptor alle PDGF-Isoformen und der β -Rezeptor nur PDGF-BB bindet (Hart et al., 1988; Heldin et al., 1988) liefern eine plausible Erklärung dafür, wie sich Wirkungsunterschiede der 35 PDGF-Isoformen über deren unterschiedliche Potenz zur Rezeptorkaktivierung entfalten können. Die meßbaren unterschiedlichen *in vitro*-Effekte der PDGF-Isoformen, zusammen mit dem Nachweis

zweier verschiedenener Rezeptorpopulationen, lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche *in vivo* Wirkungsspektren von PDGF-AA, AB und BB zu. Daher ist die Produktion von reinem PDGF-AB, ohne PDGF-BB oder PDGF-AA als Begleitproteine, wünschenswert.

5

Für die Expression von PDGF oder PDGF-Analogen wurden zahlreiche der eingangs erwähnten Expressionssysteme (Hefe, Bakterien, Säugerzellen) eingesetzt. Versuche, die PDGF-Ketten A und B in heterologen Systemen zu exprimieren, haben sich bisher im wesentlichen auf die nachfolgend genannten Beispiele beschränkt.

Erstmals gelang Kelly et al (1985) die Expression von biologisch aktiven PDGF-BB Homodimeren in Hefezellen. Ein wesentlicher Nachteil der bisher publizierten Strategien zur Herstellung von heterodimerem PDGF-AB oder PDGF-AB Analogen in eukaryontischen Zellen, beispielsweise rekombinannten CHO-Zellen (Östman et al., 1988) oder mit Hilfe von Hefe-Expressionssystemen [EP 0 259 632] ist die nicht beeinflußbare Coexpression unerwünschter homodimerer PDGF-Nebenprodukte, die in nachgeschalteten Protein-Reinigungsprozessen entfernt werden müssen. Die Quantifizierung der in CHO-Zellen exprimierten unterschiedlichen PDGF-Dimere ergab 19% für PDGF-AA, 69% für PDGF-AB und 12% für PDGF-BB (Östman et al., 1988).

Erste Versuche, die PDGF-B Kette in Prokaryonten zu exprimieren, führten nicht zu biologisch aktiven Produkten (Devare et al. 1984; Wang & Williams, 1984), da in diesen Zellen das für die spontane Assoziation der monomeren Untereinheiten notwendige Milieu fehlt. Eine erfolgreiche *in vitro*-Renaturierung von PDGF-BB Homodimeren wurde erstmals von Hoppe et al (1989, s.a. WO 90/04035) beschrieben. Nach Expression der mATUREN PDGF-B Kette als Fusionsprotein in *E. coli* und anschließender Freisetzung des monomeren PDGF-B durch chemische Spaltung gelang die Rekonstitution der Monomere zu einem wachstumsstimulierenden rPDGF-BB. In gleicher Weise wurde auch wachstumsstimulierendes PDGF-AA und AB gewonnen (Hoppe et al., 1990, s.a. WO 90/08163). Als Folge der Fusionsprotein-Expression weist die nach diesem Verfahren iso-

lierte PDGF-B Kette eine N-terminale Verkürzung um 12 Aminosäuren, sowie eine C-Terminale Verlängerung um 5 Aminosäuren auf. In WO 91/08762 wird ein weitgegend analoges Verfahren für die Herstellung von PDGF-AB in Prokaryonten beschrieben. Beide PDGF-5 Ketten wurden hier durch direkte cytoplasmatische Expression gewonnen.

Weder existierte bisher ein Hochleistungsexpressionssystem zur direkten cytoplasmatischen Expression der PDGF-Ketten in Bakterien noch wurde ein bicistronisches System zur gemeinsamen Expression beider Ketten in derartigen Zellen beschrieben.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Verfahren zur rekombinanten Herstellung multimerer Proteine in Bakterienzellen und Mittel 15 zur Verwendung in diesen Verfahren zu schaffen, mit deren Hilfe es möglich ist, die Komponenten und/oder Untereinheiten multimerer Proteine in ein und derselben Bakterienzelle zu exprimieren und gleichzeitig die Syntheseraten der cytoplasmatisch koexprimierten Proteinuntereinheiten entsprechend den stöchiometrischen 20 Verhältnissen zu steuern, die für eine nachfolgende *in vitro* Multimerisierung oder den Zusammenbau zu einem heteromeren Proteinkomplex wünschenswert oder notwendig sind. Insbesondere sollen Verfahren und Mittel geschaffen werden, mit Hilfe derer die Produktion rekombinanter Proteine in großen Mengen zu wirtschaftlichen Bedingungen möglich ist.

Zur Lösung der Aufgabe wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung multimerer Proteine in Bakterienzellen vorgeschlagen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

30

- a) die Zellen mit einem Vektor transformiert, der eine multicistronische Expressionseinheit der allgemeinen Formel

$$p = (TIS - C)_n$$

35

enthält, in der

"p" ein bakterieller transkriptionaler Promotor und

"(TIS - C)_n" repetitive Gruppen sind, innerhalb derer

5 "C" jeweils für eine Untereinheit oder eine Komponente eines multimeren Proteins kodierende DNA-Sequenzen sind, die keine für ein Signalpeptid kodierende Region umfassen, wobei die Sequenzen "C" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS - C" untereinander gleich und/

10 oder verschieden sein können,

15 "TIS" synthetische und/oder natürliche bakterielle nicht translatierte "leader" Sequenzen sind, die jeweils mit "C" eine chimäre "TIR" bilden, wobei die Sequenzen "TIS" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS - C" untereinander gleich und/oder verschieden sein können, und

n eine natürliche Zahl ≥ 2 ist,

20 wobei "p", "TIS" und "C" jeweils operativ miteinander verknüpft sind und die Expressionsrate der Protein-kodierenden Sequenzen "C" durch Auswahl der jeweils zugehörigen Sequenz "TIS" individuell gesteuert wird,

- 25
- b) die transformierten Zellen in einem geeigneten Nährmedium kultiviert und anschließend
 - c) die Zellen von dem Medium abtrennt, die Expressionsprodukte der Sequenzen "C" aus dem Cytoplasma der Zellen isoliert, gegebenenfalls renaturiert und zu dem funktionellen multimeren Protein rekonstituiert.

30 In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung werden die rekombinanten Gene in Form einer polycistronischen mRNA von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert. Die gewünschten definierten Syntheseraten der Genprodukte bzw. ihr Stöchiome-

trisches Verhältnis zueinander, das für die weiteren Renaturierungs- und Rekonstitutionsexperimente notwendig ist, wird mittels "genetischer Titration" auf der Ebene der Initiation der Translation eingestellt. Zu diesem Zweck werden für jedes der 5 cotranskribierten Cistrons chimäre TIRs bestehend aus bakteriellen oder synthetischen nicht-translatierten DNA-Sequenzen "TIS" einerseits und den angrenzenden rekombinanten Nukleotidsequenzen der kodierenden Gene andererseits so ausgewählt bzw. konstruiert oder modifiziert, daß die gewünschte Translationseffizienz erreicht wird. Dies kann dadurch erreicht werden, daß für das erste Cistron der multicistronischen Expressionskassette gemäß Erfindung eine effiziente natürlicherweise vorkommende TIS wie z. B. die des lacZ-Gens aus *E. coli* (Taniguchi et al., 1980; de Boer et al., 1983), des Replicase-Gens des RNA-Phagen MS2 (Re-15 maut et al., 1983; Sollazzo et al., 1985), des lpp-Gens aus *E. coli* (Nakamura und Inouye, 1982), des atpE-Gens aus *E. coli* (McCarthy et al., 1985; Schauder et al., 1987; Belev et al., 1991), des cro-Gens des Phagen Lambda (Sollazzo et al., 1985) und des Gens10 des Phagen T7 (Studier et al., 1990; Ollins und 20 Rangwala, 1990) oder ein synthetischer "leader" [vergleiche Jay et al. (1981), Crowl et al. (1985), Stanssens et al. (1985) und andere] eingesetzt wird und über Auswahl und ggf. Modifikation der TIS des zweiten und aller weiteren Cistrons die Expressionshöhe der nachfolgenden Cistrons auf den gewünschten Wert titriert wird. Als für diese Zwecke besonders geeignet erwies sich die erfindungsgemäß beschriebene TIS B-Sequenz (SEQ ID NO: 15). Durch eine Modifikation der TIS-Sequenzen bzw. der Effizienzen der Translations-Initiation der Gene einer Transkriptionseinheit lassen sich auch andere Faktoren, die die Effizienz der Trans-25 lation eines der Gene beeinflussen können, wie z. B. differenzielle Stabilitäten in mRNA-Abschnitten der verschiedenen Cistrons kontrolliert kompensieren, ohne daß in die kodierenden Bereiche der rekombinanten DNA-Sequenzen eingegriffen werden muß. Wenn beispielsweise für beide Cistrons einer bicistronischen Expressionskassette gleiche TIS-Sequenzen eingesetzt werden, ist in der Regel eine 1:1 Stöchiometrie der Genexpression nicht zu erwarten. Wie bereits dargelegt, beinhaltet nämlich 30 35

eine TIR in ihrer Gesamtheit neben der TIS auch den extremen 5'-Bereich der codierenden Sequenz des nachfolgenden Cistrons. Da sich die codogenen Sequenzen in einem bi- oder multicistronischen Konstrukt üblicherweise unterscheiden, liegen selbst mit 5 gleichen TIS-Sequenzen ungleiche TIRs vor mit der Folge, daß die Translationseffizienzen in der Regel unterschiedlich sein werden. Neben der Insertion verschiedener TIS-Sequenzen vor das jeweils stromabwärts lokalisierte Cistron und nachfolgender Ermittlung des Expressionsergebnisses ist es auch möglich, eine 10 (Fein-) Regulation der Expressionshöhe nach Sekundärstrukturanalyse der abgeleiteten mRNA durchzuführen. Dabei wird die mRNA-Struktur im Bereich der TIR durch gebräuchliche Computerprogramme, z. B. nach Zuker und Stiegler (1981), errechnet und dann im Hinblick auf Sekundärstrukturen, die die Translations-15 Initiation stören, analysiert. In der Regel kann durch die Eliminierung von Basenpaarungen insbesondere zwischen G-C (dreifache Wasserstoffbrückenbindung) im Bereich der TIR durch eine Destabilisierung von Strukturen höherer Ordnung eine verbesserte Zugänglichkeit von Ribosomen an die Ribosomenbindestelle und 20 damit eine Erhöhung der Effizienz der Initiation der Translation erreicht werden. Die Einführung von z. B. zusätzlichen G-C Basenpaaren in den gleichen Bereich der TIR hat einen gegenteiligen Effekt, vgl. McCarthy (1991).

25 Die Erfindung schließt ferner Mittel zur Durchführung des Verfahrens ein, insbesondere multicistronische Expressionseinheiten zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 1, welche durch die allgemeine Formel

gekennzeichnet sind, in denen "p", "TIS" und "C" die oben angegebene Bedeutung haben.

35 Erfindungsgemäß ist "n" vorzugsweise eine natürliche Zahl von 2 bis 10, und in besonders bevorzugter Weise 2 oder 3.

Als Promotoren "p" kommen alle diejenigen Promotoren in Betracht, die in prokaryontischen Zellen wirksam sind, d. h., die die Genexpression in Prokaryonten initiieren können. Insbesondere können alle konstitutiven und induzierbaren Promotoren, beispielweise die des trp- oder lac-Operons von *E. coli*, der tac-Promotor, die Promotoren P_L und P_R des Bakteriophagen Lambda, der Promotor des Bakteriophagen T7 etc. verwendet werden. Erfindungsgemäß ist der P_R Promotor des Bakteriophagen Lambda bevorzugt.

10

Die multicistronischen Expressionseinheiten zur Verwendung im Rahmen der Erfindung können an ihrem 3'-Ende operativ mit einem bakteriellen Transkriptions-Terminator verknüpft sein. Ferner kann die Expressionseinheit mit einem Gen "r" mit eigenem Promotor gekoppelt sein, welches für ein Repressormolekül für den Promotor "p" kodiert.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist "p" der λP_R -Promotor oder der λP_L -Promotor und "r" das cI857-Gen für den temperatursensitiven λ -Repressor.

Wie oben im einzelnen dargelegt, können die erfindungsgemäß verwendeten "TIS"-Sequenzen natürlichen Ursprungs sein oder es kann sich um modifizierte natürliche oder synthetische Sequenzen handeln. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind die "TIS"-Sequenzen TIS B gemäß SEQ. ID. NO: 15 und TIS E gemäß SEQ. ID. NO: 14.

Die Sequenzen "C" können rekombinante DNA-Sequenzen sein, die für Untereinheiten heteromerer Proteine wie PDGF-AB, VEGF, Scatter-Factor (HGF-SF), Mitglieder der TGF- β Superfamilie, Bone Morphogenic Protein (BMP), Faktoren der Integrin/Cadherin Familie, Immunglobuline, Histokompatibilitätsantigene, Hämoglobin oder T-Zell Rezeptoren bzw. deren natürliche oder synthetische Varianten kodieren.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind in der verwendeten multicistronischen Expressionseinheit "n" gleich 2 und die Sequenzen "C" der beiden repetitiven Einheiten "(TIS - C)₂" enthalten alternativ ein für die A- oder die B-Kette 5 von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen, wobei beide Sequenzen gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei einer der Sequenzen "C" um die PDGF-A_k-Sequenz (SEQ. ID. NO: 12) 10 oder die PDGF-A_L-Sequenz, welche für die reife PDGF-A-Kette kodiert. In einem derartigen Konstrukt ist vorzugsweise die jeweils andere "C"-Sequenz die vollständige PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10, welche für die reife PDGF-B-Kette SEQ. ID. NO: 11 kodiert oder das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder 15 Varianten dieser Sequenzen.

Die Erfindung schließt ferner rekombinante DNA-Vektoren ein, welche die erfindungsgemäßen multicistronischen Expressionseinheiten enthalten und in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum 20 Transformieren der Bakterienzelle verwendet werden. Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugter Vektor ist in Figur 1 und dessen Herstellung in Abschnitt 2 Punkt 1 dargestellt. Schließlich betrifft die Erfindung prokaryontische Wirtszellen, die mit den zuvor genannten Vektoren transformiert sind, welche die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten tragen. Erfindungsgemäß sind 25 E. coli-Zellen als Wirtszellen bevorzugt.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform dient die Erfindung der rekombinanten Herstellung von PDGF-AB und diese 30 enthaltende Arzneimittel. Erfindungsgemäß wurden erstmals die PDGF-Gene A und B gemeinsam in einer prokaryontischen Wirtszelle exprimiert mit dem Ziel, beide Genprodukte in denaturierter Form bereits in geeigneten Mengenverhältnissen für die nachfolgende *in vitro*-Rekonstitution zum biologisch aktiven Heterodimer zu 35 gewinnen. Die Steuerung der Syntheseraten der PDGF-A- und PDGF-B-Monomere im Cytoplasma von E. coli entsprechend den stöchiometrischen Verhältnissen, die für eine nachfolgende *in vitro*-Dime-

risierung zum AB-Heterodimer vorteilhaft sind, bietet die Grundlage zur Entwicklung neuartiger effektiver Präparationstechniken für dieses Dimer. Aufgrund ihres sehr ähnlichen Molekulargewichtes lassen sich die PDGF-A- und PDGF-B-Ketten mit Hilfe eines 5 Gelfiltrationschromatographieschrittes zusammen, ohne das durch die erfindungsgemäße "genetische Titration" eingestellte Verhältnis der verschiedenen Ketten zueinander während der Präparationsprozedur zu variieren, weiter aufreinigen, renaturieren und zum biologisch aktiven PDGF-AB-Heterodimer rekonstituieren. 10 Weitere aufwendige Arbeitsschritte wie die Probekondensierung, mit der die optimalen Mengenverhältnisse der getrennt isolierten PDGF-Ketten A und B für die nachgeschaltete Renaturierung zum PDGF-AB eingestellt werden, können entfallen, da die Expressionshöhe beider PDGF-Ketten zueinander über die "genetische 15 Titration", d.h. die individuelle Expressionshöhe bereits festgelegt ist. Andererseits ist es möglich, die Dimerisierung direkt, ohne weitere dazwischengeschaltete Reinigungsschritte mit dem gesamten solubilisierten Einschlusßkörperprotein durchzuführen. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß für alle weiteren 20 notwendigen Reinigungs- und Analyseschritte PDGF-Dimere, die wegen ihrer besseren Wasserlöslichkeit leichter zu handhaben sind als die Monomere, eingesetzt werden können. Die PDGF-Dimere können nachfolgend zusammen mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zu Arzneimitteln formuliert werden.

25

Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Herstellung PDGF-AB betrifft die Erfindung gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine bicistronische Expressionseinheit für die simultane und direkte Expression von für PDGF-A- und PDGF-B 30 kodierenden DNA-Sequenzen in einer Bakterienzelle, welche gekennzeichnet ist durch die allgemeine Formel

$$p - TIS_1 - C_1 - TIS_2 - C_2 - t - r,$$

35 in der

"p" der λP_R -Promotor ist,

"C₁" und "C₂" alternativ Sequenzen enthalten, die für PDGF-A oder PDGF-B kodieren und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit enthalten sind,

5 TIS₁ und TIS₂ jeweils die Sequenz TIS B (SEQ. ID. NO: 15) oder TIS E (SEQ. ID. NO: 14) sind und untereinander gleich oder verschieden sein können,

10 "t" der Terminator des Bakteriophagen fd ist und
"r" das cI857-Gen für den temperatursensitiven λ-Repressor ist.

In der erfindungsgemäßen Expressionseinheit zur Herstellung von
15 PDGF-AB Heterodimeren können die Cistrons C₁ und C₂ alternativ die reife PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10, deren Analoga oder jegliches Fragment enthalten, welches für eine biologisch wirksame PDGF-B-Kette kodiert; insbesondere kommt in diesem Zusammenhang der zur maturen PDGF-B-Kette homologe Bereich des
20 v-sis-Gens, das Produkt des Simian Sarcoma Virus, in Betracht, während das jeweils andere Cistron C₁ oder C₂ die lange oder kurze PDGF-A-Sequenz (PDGF-A_L oder PDGF-A_K gemäß SEQ. ID. NO: 12) sowie jegliche Fragmente enthalten, welche für eine biologisch aktive PDGF-A-Kette kodieren, d.h. eine der beiden Sequenzen C₁
25 oder C₂ enthält die PDGF-B-Sequenz und die jeweils andere die PDGF-A-Sequenz.

Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß Expressionseinheiten, in denen

30 a) "TIS₁" die TIS B Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 15, "TIS₂" die TIS E Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 14, "C₁" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 und "C₂" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 sind,

- b) "TIS₁" und "TIS₂" die TIS B Sequenzen gemäß SEQ. ID. NO: 15, "C₁" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 und "C₂" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 sind oder
- 5 c) "TIS₁" und "TIS₂" die TIS B Sequenzen gemäß SEQ. ID. NO: 15 sind, "C₁" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 und "C₂" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 sind.

Die Erfindung schließt ferner Vektoren zur Verwendung bei der
10 Herstellung von PDGF-AB ein, welche die zuvor erläuterten bici-
stronischen Expressionseinheiten enthalten. Ein besonders bevor-
zugter Vektor ist in Figur 1 und dessen Herstellung in Ab-
schnitt 2 Punkt 1 dargestellt. Das Derivat pBS/PDGF-BA2 dieses
15 Vektors (siehe unten) steuert die außerordentlich hohe Synthese-
rate von mehr als 150 mg PDGF-A- und PDGF-B-Ketten je Liter
Kultur mittels einer Bakterienfeuchtmasse von 25 g/l. Dieser
Vektor ist damit einer der leistungsfähigsten bekannten Express-
sionssysteme für *E. coli*. Dies gilt insbesondere in Anbetracht
der Tatsache, daß es sich bei den PDGF-Ketten um kleine Proteine
20 handelt; es werden demgemäß hohe Molmengen an rekombinantem
Protein erzielt. Im Hochzelldichte-Fermentationsverfahren lassen
sich mit Zellen, die das in Figur 1 dargestellte Plasmid tragen,
noch weitaus höhere Erträge erreichen.

25 Die Erfindung betrifft ferner Bakterienzellen, welche mit einem
Vektor wie oben beschrieben transformiert sind. Gemäß einer
besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die
Zellen mit einem Vektor gemäß Figur 1 transformiert. Bevorzugte
Wirtszellen sind *E. coli*-Zellen. Die nachfolgend angegebenen
30 erfindungsgemäß transformierten Zellen wurden am 4.6.1993 bei
der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DSM hinterlegt:

- 35
1. TG2/pBS/PDGF-AB4 (DSM 8337)
 2. TG2/pBS/PDGF-BA2 (DSM 8336)
 3. TG2/pBS/PDGF-BA4 (DSM 8338)

Die Erfindung schließt weiterhin auch ein Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB durch direkte cytoplasmatische Coexpression der monomeren PDGF-Ketten A und B in prokaryontischen Wirtszellen ein, in dessen Verlauf *E. coli*-Zellen als 5 Wirtszellen, welche die erfindungsgemäße Expressionseinheit operativ insertiert enthalten, in einem geeigneten Medium kultiviert werden und das so erzeugte rPDGF in der Form biologisch inaktiver monomerer Ketten A und B gemeinsam aus den baktierellen Einschlußkörpern isoliert und zum aktiven PDGF-AB Heterodimer renaturiert wird. Generell kommen im Rahmen der Erfindung als Medium alle bekannten Medien zum Kultivieren von Prokaryonten in Betracht, einschließlich synthetischer, proteinfreier oder proteinarmer Produktionsmedien. Erfindungsgemäß wurden TB- und LB-Medien bevorzugt. Die heteromeren, renaturierten Proteine 15 können im nächsten Schritt mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zu Arzneimitteln formuliert werden.

Die direkte gemeinsame multicistronische Expression der Untereinheiten eines heteromeren eukaryontischen Proteins in Form 20 unabhängiger monomerer Komponenten im Cytoplasma einer prokaryontischen Wirtszelle ist bisher im Stand der Technik nicht bekannt; sie bietet gegenüber der bekannten monocistronischen Expression der Proteinuntereinheiten in verschiedenen Wirtszellen oder auf verschiedenen Plasmiden eine Reihe entscheidender 25 verfahrenstechnischer Vorteile. Auf dem Hintergrund der erfindungsgemäßen Lehre, die in derartigen multicistronischen Expressionseinheiten die individuelle Regulierung der Translation von Fremdgenen erlaubt, wird erfindungsgemäß ein Verfahren geschaffen, welches von höchster Wirtschaftlichkeit ist. Wie anhand der 30 erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform der Herstellung von heterodimerem PDGF-AB gezeigt, kann die Expression der einzelnen Komponenten im Verhältnis von 1:1 erzielt werden und es muß zudem nur noch ein prokaryontischer Wirtsstamm kultiviert und validiert werden, da beide Ketten PDGF-A und PDGF-B mit Hilfe 35 einer Fermenterkultur in großem Maßstab synthetisiert werden können.

Die Erfindung ist ganz generell dort anwendbar, wo die unterschiedlichen Protein-Untereinheiten heteromerer Proteine gemeinsam exprimiert und isoliert und/oder zum Multimer rekonstituiert werden sollen. Beispielsweise können auf diese Weise neben PDGF-5 AB Proteine wie VEGF, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder der TGF- β Superfamilie, Bone Morphogenic Protein (BMP), Faktoren der Integrin/Cadherin Familie, Immunglobuline, Histokompatibilitätsantigene, Hämoglobin oder T-Zell Rezeptoren bzw. deren natürliche oder synthetische Varianten hergestellt werden.

10

Schließlich umfaßt die Erfindung die Verwendung der heteromeren Proteine hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung von pharmazeutischen oder kosmetischen Präparaten. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthalten die pharmazeutischen und/oder kosmetischen Präparate PDGF-AB, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren. Bei den pharmazeutischen oder kosmetischen Präparaten kann es sich um Salben, Sprays, Gele, Wundverbände, Pflaster und/oder Wundauflagen handeln, die nach im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert:

25

Figur 1 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCYTEX P3.

30

TIS B=synthetische TIS (SEQ ID NO 15); fd=Transkriptions-Terminator des Bakteriophagen fd; cI857=Gen des Temperatur sensitiven Lambda-Repressors.

35

Figur 2 Schematische Darstellung der verschiedenen bicistronischen Konstrukte auf Basis von pCYTEX P3
PDGF-A=Gen für die reife humane PDGF-A-Kette; PDGF-B=Gen für die reife humane PDGF-B-Kette; $P_r=P_R$ -Promotor des Bakteriophagen Lambda; TIS B=synthetische TIS (SEQ ID NO 15); TIS E=TIS des atpE-Gens aus pCYTEX P1 (SEQ

ID NO: 14); fd=Transkriptions-Terminator des Bakteriophage fd.

Figur 3 Einschlußkörperpräparationen nach Hoppe et al. (1989) aus Zellen des *E. coli* Stammes TG2 transformiert mit bicistronischen Konstrukten gemäß Figur 2.

Zur Analyse wurden Einschlußkörper aus 100 ml-Schüttelkulturen Plasmid-tragender Zellen aufgearbeitet und gleiche Mengen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) in Gegenwart von 5% Mercaptoethanol und unter Verwendung eines Gels mit 15% Acrylamid und 0,475% Bisacrylamid aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassieblau gefärbt. Protein-Standard (1), Einschlußkörper aus Zellen mit pBS/PDGF-B (2), pBS/PDGF-A (3), pBS/PDGF-BA1 (4), pBS/PDGF-BA2 (5), pBS/PDGF-BA4 (6), pBS/PDGF-AB1 (7), pBS/PDGF-AB2 (8) und pBS/PDGF-AB4 (9).

Figur 4 Gemeinsame Aufreinigung der PDGF-A- und PDGF-B-Monomere aus solubilisiertem Einschlußkörperprotein über Gelfiltration.

Gezeigt sind neben Protein-Standard (2) das auf die Säule aufgetragene rohe Einschlußkörperprotein aus Zellen mit dem Plasmid pBS/PDGF-BA2 (1) und die aus der Chromatographie resultierenden proteinhaltigen Fraktionen (3-14). Die PDGF-A- und PDGF-B-Ketten werden gemeinsam unter Beibehaltung des durch genetische Titration eingestellten stöchiometrischen Verhältnisses von 1:1 aufgereinigt (Spuren 11-13). Aufgrund der relativen Sauberkeit der PDGF-Ketten bereits auf der Stufe der Einschlußkörperpräparationen (1; vergleiche Figur 3 ist dieser eine Gelfiltrationsschritt ausreichend, um Proteinpräparationen einer Reinheit von ≥90% zu erzielen. Die Proben wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) in Gegenwart von

5% Mercaptoethanol und unter Verwendung eines Gels mit 15% Acrylamid und 0,475% Bisacrylamid aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassieblau gefärbt.

5 Figur 5 Dimerisierung der gemeinsam über Gelfiltration aufgereinigten PDGF-A- und PDGF-B-Monomere.

10 Protein-Standard (1); Dimerisierungsansatz mit gemeinsam über Gelfiltration aufgereinigten PDGF-A- und PDGF-B-Ketten (2; 7, nach Reduzierung der Probe mit 5% Mercaptoethanol); PDGF-AB-Heterodimer, von den Monomeren des Dimerisierungsansatzes über Ionenaustauschchromatographie abgetrennt (3, 8, nach Reduzierung der Probe mit 5% Mercaptoethanol); aus monocistronisch
15 exprimierten und einzeln aufgereinigten Monomeren rekonstituiertes PDGF-AB (4), PDGF-BB (5) und PDGF-AA (6) als Kontrollen. Die Proben wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Gels mit 15% Acrylamid und 0,475% Bisacrylamid aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassieblau
20 gefärbt.

Figur 6 Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-AB mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers: Eichkurven von PDGF-Standards.

30 Polystyrolplatten wurden mit Schaf-Anti-Maus-IgG beschichtet und anschließend mit einem Maus-Hybridomaüberstand (von Klon 1B3, enthält monoklonale Antikörper gegen die B-Kette in PDGF-AB und -BB) inkubiert; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF Standards wurde das gebundene PDGF mit Hilfe eines polyklonalen KaninchenAnti-PDGF-AA, gefolgt von Peroxidase-markiertem
35 Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen;
Quelle der PDGF-Standards:

AB: aus humanen Thrombozyten, von PROMEGA Corp. No. G 5161;

oder analog WO 90/08163 aus *E. coli* (monocistronische Expression als Fusionsprotein für PDGF-A und PDGF-B).

5 Die durch die Fusionsprotein-Expression gewonnene PDGF-B Kette weist im Gegensatz zu dem durch direkte Expression gewonnenen Material eine Verkürzung am N-Terminus um 12 Aminosäuren und eine C-terminale Verlängerung um 5 Aminosäuren auf. Bei der Fusionsgen-expression analog WO 90/08163 wurde anstelle des die PDGF-B-Kette enthaltenden Plasmids pE-pF14 (s.a. WO 90/04035) das Konstrukt pBX eingesetzt. Dieses Konstrukt führt zur Expression einer PDGF-B-Kette mit korrektem C-Terminus.

15

BB: rekombinant aus *E. coli* (pBS/PDGF-B)

B : rekombinant aus *E. coli* (pBS/PDGF-B)

AA: rekombinant aus *E. coli* (pBS/PDGF-A)

A : rekombinant aus *E. coli* (pBS/PDGF-A)

20

Figur 7 PDGF-AB-ELISA zur Analyse verschiedener PDGF-AB Präparationen. Untersucht wurden Präparationen aus unterschiedlichen mono- und bicistronischen PDGF-Expressionskonstrukten: (Eichkurven von Standards (siehe Figur 6).

25

2. Beispiel: Steuerung der bicistronischen Expression der monomeren PDGF-Ketten A und B im Cytoplasma von *E. coli* und Rekonstitution der Monomere zum biologisch aktiven Heterodimer

5

2.1 Herstellung des Expressionsvektors und der bicistronischen PDGF-Genkonstruktionen

2.1.1 Herstellung des Expressionsvektors pCYTEX P3

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors, wie sie in Tabelle 1 beschrieben ist, und zur weiter unten (2.1.4) geschilderten Konstruktion der verschiedenen bicistronischen Plasmidkonstrukte und deren Vorstufen, wurden Standardmethoden der rekombinanten DNA-Technologie (Sambrook et al., 1989; Maniatis et al., 1982) eingesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Expressionsvektors pCYTEX P3

20

SEQUENZ	HERKUNFT/KONSTRUKTION
---------	-----------------------

25

Lambda P _R Promotor	synthetisches Oligodesoxyribonukleotidpaar mit <i>Sma</i> I bzw. <i>Bgl</i> II kompatiblen Enden
--------------------------------	--

30

TIS B	synthetisches Oligodesoxyribonukleotidpaar mit <i>Bgl</i> II bzw. <i>Nde</i> I kompatiblen Enden
-------	--

35

fd Terminator	Terminator des Bakteriophagen fd nach Subklonierungen als <i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I Fragment eingebaut
---------------	---

40

<i>cI857</i> Repressoren	nach Einfügung einer <i>Kpn</i> I-Schnittstelle stromauf-wärts von dessen Promotorsequenz mittels <u>in vitro</u> Mutagenese als <i>Kpn</i> I/ <i>Not</i> I Fragment aus pCYTEXP1 eingebaut
--------------------------	---

Ampicillin-Resistenzgen *Nde*I/*Pvu*II-Fragment aus pUC18 und Replikationsursprung

Nach dem Einbau eines *NotI/SmaI*-Adaptors zwischen die *NdeI* und *EcoRI* Schnittstellen, wodurch diese zerstört worden sind, wurde die subklonierte Expressionskassette zwischen die *NotI* und *PvuII* Schnittstellen in pUC18 insertiert. Die 5 schematische Darstellung des Vektors ist in Figur 1 und die Sequenz von dessen Expressionskassette inklusive flankierender Bereiche ist in SEQ ID NO: 16 dargestellt. In diesem Vektor erfolgt die Transkription eines zwischen den Schnittstellen *NdeI* bis *XbaI* eingefügten Gens vom *P_R*-Promotor des Bakteriophagen Lambda aus und wird am Transkriptions-Terminator des fd Phagen beendet. Das zur Kontrolle der Transkription notwendige *cI857*-Gen, das für den Temperatur-sensitiven Repressor des Lambda-Promotors kodiert, ist ebenfalls auf dem Vektor enthalten, um die Verwendung 10 dieses Expressionsvektors unabhängig vom Vorhandensein eines chromosomal kodierten Repressors in der Zelle zu machen. Die Transkription der unter der Kontrolle des Lambda *P_R*-Promotors befindlichen Gene ist in Zellen, die bei 30° C kultiviert werden, reprimiert und wird nach Inaktivierung des Repressors durch Erhöhung der Inkubationsstemperatur auf 40-42° C effektiv induziert. Zur Sicherstellung der effektiven Translations-Initiation lässt sich ein rekombinantes Gen über die *NdeI* Schnittstelle mit seinem Startcodon an die synthetische TIS B des Vektors anschließen.

2.1.2 Mutagenese am humanen PDGF-B-Gen

Das Plasmid pMVW-2 enthält die cDNA des humanen PDGF-B Gens, welches im 5'-translatierten Bereich der Vorläufersequenz unvollständig ist (Weich et al., 1986; SEQ ID NO: 1). Für die direkte Expression in *E. coli* wurde durch *in vitro* Mutagenesen an das 5'-Ende des reifen PDGF-B-Gens eine *NdeI*-Schnittstelle (enthält die Information für die Startaminosäure Methionin) und Stop-Codons an das 3'-Ende des maturen PDGF-B Gens eingeführt. Hierfür wurde zunächst das 30 914 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus pMVW-2 über einen syntheti- 35

schen Adapter [Oligomere NCCLSA1 und NCCLSA2 (SEQ ID NO: 5 + 6)] in den *Bam*HI/*Sal*I-gespaltenen Bakteriophagen M13mp19 (Pharmacia) insertiert. Dieses Konstrukt lieferte die notwendige Einzelstrang-DNA für die nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritte, die mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785; Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698; Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 791-802] durchgeführt wurden. Als Mutageneseprimer wurden die synthetischen Primer PDGBNDE und PDGBTGA (SEQ ID NO: 7 und 8) eingesetzt. Als Mutageneseprodukt wurde die aminoterminal um ein zusätzliches Methionin verlängerte Sequenz der maturen PDGF-B Kette (SEQ ID NO: 10) in M13/PDGF-B erhalten.

2.1.3 Mutagenese am humanen PDGF-A-Gen

Das Plasmid pODA (Eichner et al., 1989) enthält die vollständige Sequenz des humanen PDGF-A Precursors (SEQ ID NO: 3). Für die direkte Expression in *E. coli* wurde durch *in vitro* Mutagenese an das 5'-Ende des reifen PDGF-A-Gens eine *Nde*I-Schnittstelle (enthält die Information für die Startaminosäure Methionin) eingeführt. Hierfür wurde pODA zunächst mit *Eco*RI linearisiert, die resultierenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I von *E. coli* zu glatten Enden aufgefüllt und das nach Verdau mit *Bam*HI entstehende Fragment in den Expressionsvektor pCYTEX P1 insertiert. Dieser war zunächst mit *Sph*I geschnitten, dann mit Mung bean Nuklease behandelt und darauf mit *Bam*HI geschnitten worden. Mit Hilfe des Helferphagen M13K07 wurde von diesem Konstrukt, pCYT-A-1, die Einzelstrang-DNA für den nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritt präpariert (Sambrook et al., 1989), der mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor

J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785; Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698; Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 791-802] durchgeführt wurde.

5 Als Mutagenesepriimer wurde der synthetische Primer PDGANDE (SEQ ID NO: 9) eingesetzt. Als Mutageneseprodukt wurde die aminoterminal um ein zusätzliches Methionin verlängerte Sequenz der maturen PDGF-A Kette (SEQ ID NO: 12) in pCYT-A-2 erhalten.

10

2.1.4 Herstellung der bicistronischen PDGF-Genkonstrukte

Basierend auf diesem Vektorsystem wurden die verschiedenen in Figur 2 dargestellten bicistronischen PDGF-Genkonstrukte hergestellt. Die Konstruktion dieser Plasmide wurde inklusive der verschiedenen Subklonierungen wie in Tabelle 2 beschrieben durchgeführt. Alle Klonierungen wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Tabelle 2: Plasmidkonstruktionen

5	PLASMID	KONSTRUKTION
10	pCYT-A3	Entfernung des nicht gewünschten PDGF-A-Vorläufergenanteils durch <i>NdeI</i> Verdau von pCYT-A2 und Religation des Vektorfragmentes, wobei PDGF-A an die TIS E-Sequenz des Vektoranteils angeschlossen wurde
15	pCYT-B	Klonierung des <i>NdeI/SalI</i> -Fragmentes mit der Sequenz für die reife PDGF-B-Kette aus M13/PDGF-B in pCYTEX P1 geschnitten mit <i>NdeI</i> und <i>SalI</i> , wobei PDGF-B an die TIS E-Sequenz des Vektoranteils angeschlossen wurde
20	pCYT-BA	Klonierung des durch vollständige Spaltung mit <i>BamHI</i> und partielle Spaltung mit <i>NdeI</i> entstandenen Fragmentes aus pBS/PDGF-BA2 mit PDGF-B ohne TIS gefolgt von PDGF-A mit TIS E in pCYTEX P1, wobei PDGF-B an die TIS E-Sequenz des Vektoranteils angeschlossen wurde
25	pCYT-B2	Klonierung des <i>XhoI/SalI</i> -Fragmentes mit PDGF-B aus pCYT-B in pCYTEX P1 geschnitten mit <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> , wobei sowohl die <i>XhoI</i> - als auch die <i>EcoRI</i> -Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden
30	pCYT-B3	Klonierung des <i>SpeI/SalI</i> -Fragmentes mit PDGF-B aus pBS/PDGF-B in pCYTEX P1 geschnitten mit <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> , wobei sowohl die <i>SpeI</i> - als auch die <i>EcoRI</i> -Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden
35	pCYT-AB1	Klonierung des <i>XhoI/BamHI</i> -Fragmentes mit PDGF-A inklusive TIS E aus pCYT-A3 in pCYT-B2 geschnitten mit <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i>
40	pCYT-AB2	Klonierung des <i>SpeI/BamHI</i> -Fragmentes mit PDGF-A inklusive TIS B aus pBS/PDGF-A in pCYT-B2 geschnitten mit <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> , wobei sowohl die <i>SpeI</i> - als auch die <i>XhoI</i> -Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden.
45		
50		

- 5 pCYT-AB4 Klonierung des *SpeI/BamHI*-Fragmentes mit PDGF-A inklusive TIS B aus pBS/PDGF-A in pCYT-B3 geschnitten mit *XhoI* und *BamHI*, wobei sowohl die *SpeI* - als auch die *XhoI*-Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden.
- 10 pBS/PDGF-B Klonierung des PDGF-B-Gens aus pCYT-B als *NdeI/XbaI*-Fragment in vollständig mit *NdeI* und partiell mit *XbaI* gespaltenen pCYTEX P3, Anschluß an TIS B
- 15 pBS/PDGF-A Klonierung des PDGF-A-Gens aus pCYT-A3 als *NdeI/BamHI*-Fragment in pCYTEX P3 geschnitten mit *NdeI* und *BamHI*, Anschluß an TIS B
- 20 pBS/PDGF-BA1 Klonierung des *XhoI/BamHI*-Fragmentes aus pCYT-BA mit PDGF-B inklusive TIS E gefolgt von PDGF-A ebenfalls mit TIS E in pCYTEX P3 geschnitten mit *SpeI* und *BamHI*, wobei sowohl die *SpeI* - als auch die *XhoI*-Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden.
- 25 pBS/PDGF-BA2 Klonierung des PDGF-A-Gens inklusive TIS E als *XhoI/BamHI*-Fragment aus pCYT-A3 in vollständig mit *BamHI* und partiell mit *Sall* geschnittenen pBS/PDGF-B
- 30 pBS/PDGF-BA4 Klonierung des PDGF-A-Gens inklusive TIS B aus pBS/PDGF-A als *SpeI/BamHI*-Fragment in vollständig mit *BamHI* und partiell mit *Sall* geschnittenen pBS/PDGF-B, wobei sowohl die *SpeI* - als auch die *Sall*-Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt.
- 35 pBS/PDGF-AB1 Klonierung des *XhoI/XbaI*-Fragmentes mit dem PDGF-A-Gen inklusive TIS E gefolgt von PDGF-B ebenfalls mit TIS E aus pCYT-AB1 in pCYTEX P3 geschnitten mit *SpeI* und *BamHI*, wobei sowohl die *SpeI* - als auch die *XhoI*-Enden der DNA-Fragmente zuvor mittels des Klenow-Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt wurden.
- 40 pBS/PDGF-AB2 Klonierung des *SpeI/XbaI*-Fragmentes mit dem PDGF-A-Gen inklusive TIS B gefolgt von PDGF-B mit TIS E aus pCYT-AB2 in pCYTEX P3 geschnitten mit *SpeI* und *BamHI*
- 45 pBS/PDGF-AB4 Klonierung des *SpeI/XbaI*-Fragmentes mit dem PDGF-A-Gen inklusive TIS B gefolgt von PDGF-B ebenfalls mit TIS B aus pCYT-AB1 in pCYTEX P3 geschnitten mit *SpeI* und *BamHI*

2.2 Anzucht und Aufarbeitung der Zellen

2.2.1 Anzucht Plasmid tragender Zellen

5 *E. coli* Zellen transformiert mit einem der bicistronischen
Plasmide wurden auf LB - oder TB Medium mit 0,05-0,1 mg/ml
Ampicillin zunächst bei 30° C angezogen, um den Promotor
des Bakteriophagen Lambda durch die Wirkung des bei dieser
Temperatur aktiven Repressors im inaktiven Zustand zu hal-
ten. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte in den Kul-
turen in der Phase logarithmischen Wachstums wurde die
Kultivierungstemperatur auf 42° C erhöht und damit die
Expression der PDGF-Gene induziert. Im Falle von Schüttel-
kulturen wurde bei einer optischen Dichte von ca. 0,8 und
10 für Fermenterkulturen bei ca. 10 induziert. Die Zellen
wurden spätestens beim Erreichen der stationären Wachs-
tumsphase durch Zentrifugation für 20 min bei 5000 x g
15 geerntet.

20 2.2.2 Präparation von Einschlußkörpern

Die Präparation der Einschlußkörper wurde analog Hoppe et al. (1989) durchgeführt. Dabei wurden die nach 2.2.1 geernteten Zellen in 20 ml pro Liter Kultur einer 20 mM Tris-HCl/0,5 mM EDTA, pH 7,8 aufgenommen. Abweichend von dieser
25 Methode erfolgte der Zellaufschluß mittels Ultraschallbe-
handlung. Die Einschlußkörper wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 6000 x g geerntet und einmal mit 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 2% Triton X-100 gewaschen.

30 Durch die Verwendung des pCYTEX P3-Expressionssystems zur direkten cytoplasmatischen Expression der PDGF-Gene ließen sich Syntheseraten der reifen PDGF-A- und PDGF-B-Ketten erzielen, die zur Bildung von Einschlußkörpern im Cytoplasma führen. Die hier dargestellte hohe Reinheit der PDGF-A- und PDGF-B-Ketten (etwa 90%) bereits auf der Stufe des
35 Einschlußkörperpräparationen offenbart hier einen gravie-

renden Vorteil der direkten cytoplasmatischen Expression der entsprechenden Gene mittels des Expressionsvektors pCYTEX P3 gegenüber der von Hoppe et al. (1989, s. a. WO 90/04035; 1990, s. a. WO 90/08163) eingesetzten Fusionsgenmethode. Beim letztgenannten Verfahren entstehen durch die Abspaltung des nicht gewünschten bakteriellen Fusionsgenanteils Proteinbruchstücke im Molekulargewichtsbereich der PDGF-Monomere. Fragmente dieser Art entstehen bei der direkten cytoplasmatischen Expression nicht.

Densitometrische Untersuchungen von Coomassieblau gefärbten Gelen mit den verschiedenen Einschlußkörper-Präparationen ergaben für die bicistronischen Konstrukte die in Tabelle 3 aufgeführten Verhältnisse von PDGF-A- zu PDGF-B-Monomeren. Für Zellen mit dem Plasmid pBS/PDGF-BA2 (Figur 2, DSM-Hinterlegungsnummer 8336) zeigt es sich, daß beide reifen Ketten, PDGF-B und PDGF-A, mit gleicher Rate effektiv synthetisiert und in Einschlußkörpern deponiert werden. Dieses Plasmid bietet damit verfahrenstechnische Vorteile. Beide Ketten, PDGF-A und PDGF-B, können mit Hilfe einer Fermenterkultur im großen Maßstab hergestellt werden. Damit bräuchte nur ein genetisch veränderter Organismus charakterisiert und nur ein Produktionsverfahren für beide Ketten validiert zu werden. Von den anderen bicistronischen Plasmiden werden jeweils zum Teil deutlich voneinander abweichende Expressionsraten des PDGF-A- und des PDGF-B-Gens gesteuert. Insbesondere kann mittels der Konstrukte pBS/PDGF-BA4 (DSM-Hinterlegungsnummer DSM 8338) bzw. pBS/PDGF-AB4 (DSM Hinterlegungsnummer DSM 8337, vgl. Figur 2), welche das PDGF-A- und das PDGF-B-Gen in den zwei möglichen Anordnungen jeweils mit der TIS B-Sequenz fusioniert tragen, einesfalls deutlich mehr PDGF-B- als PDGF-A-Kette und andernfalls mehr PDGF-A- als PDGF-B-Kette synthetisiert werden.

Tabelle 3: Bicistronische Expression von PDGF-A und PDGF-BVerhältnis PDGF-A : PDGF-B

5 pBS/PDGF-BA1	0,77
pBS/PDGF-BA2	0,97
pBS/PDGF-BA4	0,45
pBS/PDGF-AB1	0,9
pBS/PDGF-AB2	3,7
10 pBS/PDGF-AB4	3,6

2.3 Reinigung der PDGF Monomere und Rekonstitution zu PDGF-AB

15 Nachdem das Einschlußkörperprotein nach Hoppe et al. (1989) solubilisiert und sulfoniert worden war, wurde es über Gelfiltration aufgetrennt. Erfindungsgemäß bevorzugt wurde für die Aufreinigung der PDGF-A- und PDGF-B-Ketten eine Superdex 75 HR High Load 26/60-Säule von Pharmacia. Nach
 20 Äquilibrierung mit dem Laufmittel 4 M Guanidinium-HCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7,4 wurden 5-10 ml Probe bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgetragen. Wie in Figur 4 gezeigt wurden die PDGF-A- und die PDGF-B-Kette aufgrund ihres sehr ähnlichen Molekulargewichts mit annähernd ≥90% Reinheit in den gleichen Säulenfraktionen erhalten. Die Fraktionen wurden dar-
 25 aufhin vereinigt und über Nacht gegen 5 l Wasser dialy- siert. Nach dem Einstellen des Probenvolumens auf 15 ml durch Eintrocknen unter Vakuum erfolgte durch Zugabe von Ameisensäure und Harnstoff in Endkonzentrationen von 5% bzw. 5 M die Solubilisierung des ausgefallenen Proteinmate- rials. Nach erneuter Dialyse gegen 5 l 2 M Harnstoff wurde
 30 die PDGF-haltige Probe auf ca. 0,5 mg/ml eingestellt. An- schließend erfolgte die Dimerisierung wie bei Hoppe et al. (1989) beschrieben. Wie in Figur 5 gezeigt ist, wurde dabei nach elektrophoretischer Auftrennung des Dimerisierungs- ansatzes neben Monomerbanden das Auftreten von einer promi-
 35 nenten Bande im Molekulargewichtsbereich von ca. 28000

beobachtet. Diese zeigt das gleiche Laufverhalten im Gel wie PDGF-AB und ein deutlich anderes als PDGF-AA- und PDGF-BB-Dimere, die jeweils zur Kontrolle aus einzeln aufgereinigten Ketten rekonstituiert und durch verschiedene Analysen verifiziert wurden. Ein Vergleich der Intensitäten der Dimerbande und der Monomerbanden des elektrophoretisch aufgetrennten Dimerisierungsansatzes deutet eine Dimerisierungsrate von mehr als 50% an.

Das Dimerisierungsprodukt wurde anschließend von den Monomeren über Ionenaustauschchromatographie wie bei Hoppe et al. (1990) beschrieben mittels Fraktogel TSK SP 650(S) der Firma Merck abgetrennt. Das gereinigte Dimer (Figur 5) wurde für weitere Analysen eingesetzt.

An dieser Stelle wird deutlich, daß das bicistronische Plasmid pBS/PDGF-BA2 auch die Grundlage zur Entwicklung neuartiger effektiver Präparationstechniken für das PDGF-AB-Heterodimer bietet. Dieses Plasmid steuert die Synthese der PDGF-A und PDGF-B Monomere in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Figur 3, Tabelle 3), welches besonders günstig ist für deren *in vitro* Dimerisierung zu PDGF-AB. Aufgrund ihres sehr ähnlichen Molekulargewichtes lassen sich die PDGF-A- und PDGF-B-Ketten mit Hilfe eines Gelfiltrations-Chromatographieschrittes zusammen, ohne das durch genetische Titration eingestellte Verhältnis der verschiedenen Ketten zueinander während der Präparationsprozedur zu variieren, weiter aufreinigen, renaturieren und zum biologisch aktiven PDGF-AB-Heterodimer rekonstituieren. Aufgrund der hohen Reinheit der PDGF-Ketten bereits auf der Stufe der Einschlußkörperpräparationen bietet sich andererseits die Möglichkeit an, die Dimerisierung direkt ohne weitere Reinigungsschritte dazwischenzuschalten mit dem gesamten solubilisierten Einschlußkörperprotein durchzuführen. Der wesentliche Vorteil dieses Verfahren wäre, daß für alle weiteren notwendigen Reinigungs- und Analyseschritte PDGF-Dimere eingesetzt werden könnten, die wegen ihrer besseren

Wasserlöslichkeit leichter zu handhaben sind als die PDGF-Monomere.

2.4 Nachweis von PDGF-AB Heterodimer in den Renaturierungsproben mit Hilfe eines spezifischen PDGF-AB ELISA's

Es wurde ein 'two-antibody sandwich assay' aufgebaut, der eine spezifische Quantifizierung von PDGF-AB neben PDGF-AA und -BB erlaubt. Dabei wurde ein monoklonaler und ein polyklonaler anti-PDGF-Antikörper eingesetzt:

Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten (Fa. Dynatech, U-Platte, No. M124B) werden in folgender Reihenfolge beschichtet (zwischen jedem Schritt jeweils 4 x Waschen mit PBS mit 15 0,05% Tween 20):

- 1) Maus Monoklonaler Antikörper 1B3 [erhalten aus Überständen von Hybridomazellen, die durch Fusion von SP2/0-Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen entstanden waren. Die Mäuse waren mit rekomb. PDGF-AB (aus *E. coli* gemäß Hoppe et al., 1990) immunisiert. Der monoklonale Antikörper bindet spezifisch an der B-Kette von PDGF-Dimeren], 3 µg/ml IgG2a in Carbonat/Bicarbonat-Puffer, pH 9,6, 50 µl bei 4°C über Nacht.
- 2) 1% BSA (Fa. E. Merck, Nr. 12018) in PBS, pH 7,5, 100 µl für 1 h bei R.T.
- 3) PDGF-haltige Lösungen, verdünnt in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 (PBS+), 50 µl für 1 h bei R.T.
- 4) Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-214, bindet an der A-Kette von dimerem PDGF), 2 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T.
- 35 5) POD-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Fa. Pierce, No. 31460), 0,1 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T.,

Detektion mit dem Substrat Tetramethylbenzidin gemäß
E.S. BOS et al. (J.Immunoassay 2 (1981), 187-204).

2.5 Biologische Aktivität von renaturiertem und gereinigtem
5 rPDGF-AB

Die Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate von dich-tearretierten Fibroblasten erlaubt eine Bestimmung der mitogenen Aktivität des PDGF. Eine Unterscheidung zwischen
10 den Isoformen PDGF-AA, AB und BB ist nicht möglich, da alle PDGF-Isoformen in diesem Testsystem aktiv sind.

Der Assay wurde gemäß Shipley et al. (1984) mit AKR-2-B-Mausfibroblasten in 24-Well-Platten durchgeführt.
15

Reines PDGF zeigt in dem Test eine halbmaximale Stimulierung bei einer Konzentration von etwa 3-5 ng/ml. Die Ergebnisse aus dem Mitogentest sind in Tabelle 4 den aus dem PDGF-AB-ELISA abgeleiteten EC₅₀-Werten (Konzentration, bei
20 der ein halbmaximaler Effekt auftritt) gegenübergestellt. Die Meßdaten für rekombinantes PDGF-AB aus mono- oder biconstronischer Expression sind annähernd identisch.

Tabelle 4

Plasmid	mono- cis.	bi- cis.	EC ₅₀ gemäß PDGF-AB ELISA [µg/ml]	Unit gemäß Mitogentest [µg/ml]
5 pAX-HA +pBX (Expression als Fusionsprotein)	+	-	4	5.4
10 pBS/PDGF-B+ pBS/PDGF-A (direkte Express- sion)	+	-	5	3.0
15 pBS/PDGF-BA2 (direkte Express- sion)	-	+	3.3	3.9

15

2.6 Aminoterminale Sequenzierung von PDGF-Polypeptiden

Durch diese Untersuchungen sollte im renaturierten, durch cytoplasmatische Coexpression erhaltenen PDGF-Dimer die PDGF-Ketten A und B eindeutig nebeneinander nachgewiesen werden. Das für diese Analysen eingesetzte Material wurde mit Hilfe des bicistronischen Konstruktes pBS/PDGF-BA2 (Tabelle 2) erhalten.

25

Die automatische Sequenzanalyse wurde am Modell 477A (Applied Biosystems) mit dem Zyklus NORMAL1 durchgeführt. Die Analyse der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren-Derivate erfolgte auf dem online gekoppelten 120A PTH-Analyser. Die Disulfidbrücken der Probe wurden mit Dithiothreitol reduziert und mit 4-Vinylpyridin alkyliert.

Nach den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurden 10 µg Probe analysiert. Die Ergebnisse der Proteinsequenzanalyse von coexprimierten PDGF-Monomeren (Tabelle 5) zeigen, daß die N-terminalen Aminosäuren der PDGF-A- und PDGF-B-Kette in annähernd gleicher Ausbeute nachgewiesen werden können. Dies ist ein zusätzlicher Beleg dafür, daß die Expression mit dem patentgemäß bevorzugten Konstrukt pBS/PDGF-BA2 zu einem stöchiometrischen 1:1 Verhältnis beider PDGF-Ketten führt mit der Folge, daß durch die Anwendung der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Präparationsmethode hauptsächlich PDGF-AB-Heterodimere erhalten werden. Die relative Ausbeute der Aminosäure Serin in Position 1 wurde mit ≥96% bestimmt. Nebensequenzen (z. B. mit N-terminalem Methionin versehene PDGF-Ketten) machen daher weniger als 4% des Gesamtproteins aus.

Tabelle 5

Aminosäuresequenzanalyse der PDGF-A- und PDGF-B-Ketten

Zyklus	PDGF-A		PDGF-B	
	Code	Ausbeute (pmol)	Code	Ausbeute (pmol)
1	Ser	33,11*	Ser	
2	Ile	128,58	Leu	109,07
3	Glu	61,47	Gly	71,95
4	Glu	44,82	Ser	24,93
5	Ala	72,32	Leu	73,41
6	Val	80,22	Thr	33,90
7	Pro	54,00	Ile	44,88
8	Ala	53,49*	Ala	
9	Val	65,06	Glu	30,51

* Ausbeute aus beiden Ketten

LITERATUR

Bassford Jr., P. J., Silhavy, T. J. and Beckwith, J. R. (1979) *J. Bacteriol.* **139**, 19-31.

Belev, T. N., Singh, M. and McCarthy, J. E. G. (1991) *Plasmid* **26**, 147-150.

Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.-H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T. J. and Scott, J. (1986) *Nature* **320**, 695-699.

Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. and Horwitz, A. H. (1988) *Science* **240**, 1041-1043.

Block, L. H., Emmons, L. R., Vogt, E., Sachinidis, A., Vetter, W. and Hoppe, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2388-2392.

Boss, M. A., Kenten, J. H., Wood, C. R. und Emtage, J. S. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 3791-3806.

Brewer, S. J. and Sassenfeld, H. M. (1985) *Trends Biotechnol.* **3**, 119-122.

Brosius, J. (1984) *Gene* **27**, 161-172.

Buell, G. und Panayotatos, N. (1986) in *Maximizing Gene Expression* (Reznikoff, W. and Gold, L., eds.) pp 345-363, Butterworths, Boston.

Buell, G., Schulz, M.-F., Selzer, G., Chollet, A., Movva, N. R., Semon, D., Escanez, S. and Kawashima, E. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 1923-1938.

Cabilly, S., Riggs, A. D., Pande, H., Shively, J. E., Holmes, W. E., Rey, M., Perry, L. J., Wetzel, R. und Heynecker, H. L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3273- 3277.

Cabradilla, C. D., Groopman, J. E., Lanigan, J., Renz, M., Laskey, L. A. and Capon, D. J. (1986) *Biotechnology* **4**, 128-133.

Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, A. M., Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourrell, J. H., Shepard, H. M. and Henner, D. (1992) *Biotechnology* **10**, 163-167.

Chan, S. J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S.-D., Marks, D. and Steiner, D. F. (1981) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **78**, 5401-5405.

Chang, C. N., Rey, M., Bochner, B., Heynecker, H. and Gray, G. (1987) *Gene* **55**, 189-196.

Crowl, R., Seamans, C., Lomedico, P. and McAndrew, S. (1985) Gene 38, 31-38.

Dalboge, H., Bech Jensen, E., Tottrup, H., Grubb, A., Abrahason, M., Olafsson, I. and Carlsen, S. (1989) Gene 79, 325-332.

de Boer, H. A., Comstock, L. J. and Vasser, M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25.

Deneffle, P., Kovarik, S., Guittot, J.-D., Cartwright, T. und Mayaux, J.-F. (1987) Gene 56, 61-70.

Deuel, T. F. and Huang, J. S. (1984) J. Clin. Invest. 74, 669-676.

Devare, S. G., Shatzman, A., Robbins, K. C., Rosenberg, M., Aaronson, S. A., (1984) Cell 36, 43-49.

Duvoisin, R. M., Belin, D. und Krisch, H. M. (1986) Gene 45, 193-201.

Eichner, W., Jäger, V., Herbst, D., Hauser, H. and Hoppe, J. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 135-140.

Ellis, J., Ozaki, L. S., Gwadz, R. W., Cochrane, A. H., Nussen-zweig, V. and Gordon, G. N. (1983) Nature 302, 536-538.

Emerick, A. W., Bertolani, B. L., Ben-Bassat, A., White, T. J. and Konrad M. W. (1984) Biotechnology 2, 165-168.

Gentz, R., Kuys, Y., Zwieb, C., Taatjes, D., Taatjes, H., Bann-warth, W., Stueber, D. and Ibrahim, I. (1988) J. Bacteriol. 170, 2212-2220.

George, H. J., L'Italien, J. J., Pilacinski, W. P., Glassman, D. L. und Krzyzek, R. A: (1985) DNA 4, 273-281.

Germino, J. and Bastia, D. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4692-4696.

Gill, J. A., Sumpter, J. P., Donaldson, E. M., Dye, H. M., Souza, L., Berg, T., Wypych, J. und Langley, K. (1985) Biotechnology 3, 643-646.

Glick, B. R. and Whitney, G. K. (1987) J. Industrial Microbiol. 1, 277-282.

Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heynecker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-110.

Gold, L. (1990) Methods Enzymol. 185, 11-14.

Gray, G. L., Baldridge, J. S., McKeown, K. S., Heynecker, H. L. and Chang, C. N. (1985) Gene 39, 247-254.

- Greenhalgh, D. G., Sprugel, K. H., Murray, M. J. and Ross, R. (1990) Am. J. Pathol. **136**, 1235-1246.
- Gross, G., Mielke, C., Hollatz, I., Blöcker, H. and Frank, R. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 17627-17636.
- Gross, M., Sweet, R. W., Sathe, G., Yokoyama, S., Fasano, O., Goldfarb, M., Wigler, M. und Rosenberg, M. (1985) Mol. Cel. Biol. **5**, 1015-1024.
- Hammacher, A., Hellmann, U., Johnsson, A., Östman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, Å. and Heldin, C.-H. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 16493-16499.
- Hart, C. E., Forstrom, J. W., Kelly, J. D., Seifert, R. A., Smith, R. A., Ross, R., Murray, M. J. and Bowen-Pope, D. F. (1988) Science **240**, 1529-1531.
- Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R. and Forstrom, J. W. (1990) Biochemistry **29**, 166-172.
- Heldin, C.-H., Bäckström, G., Östman, A., Hammacher, A., Rönnstrand, L., Rubin, K., Nister, M. and Westermark, B. (1988) EMBO J. **7**, 1387-1393.
- Henning, U., Cole, S. T., Bremer, E., Hindennach, I. and Schaller, H. (1983) Eur. J. Biochem. **136**, 233-240.
- Hoppe, J., Schumacher, L., Eichner, W. and Weich, H.A. (1987), FEBS Lett. **223**, 243-246.
- Hoppe, J., Weich, H. A. and Eichner, W. (1989) Biochemistry **28**, 2956-2960.
- Hoppe, J., Weich, H. A., Eichner, W. and Tatje, D. (1990) Eur. J. Biochem. **187**, 207-214.
- Hosang, M., Rouge, M., Wipf, B., Eggiman, B., Kaufmann, F. and Hunziker, W. (1989) J. Cell. Physiol. **149**, 558-564.
- Hsiung, H. M., Mayne, N. G. and Becker, G. W. (1986) Biotechnology **4**, 991-995.
- Hsiung, H. M., Cantrell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A. J. and Becker, G. W. (1989) Biotechnology **7**, 267-271.
- Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., Miyamoto, S., Ohgi, T., Sakuragawa, Y., Fujiyama, K., Ikari, T., Kobayashi, M., Miyake, T., Shibahara, S., Ono, A., Ueda, T., Tanaka, T., Baba, H., Miki, T., Sakurai, A., Oishi, T., Chisaka, O. und Matsubara, K. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5956-5960.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R. and Riggs, A. D. (1977) Science **198**, 1056-1063.

- Ito, K. (1981) *Cell* **24**, 707-717.
- Ivanoff, L. A., Towatari, T., Ray, J., Korant, B. D. und Pette-way, S. R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5392-5396.
- Jacob, C. O., Leitner, M., Salomon, D. and Arnon, R. (1985) *EMBO J.* **4**, 3339-3343.
- Jay, G., Khoury, G., Seth, A. K. and Jay, E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5543-5548.
- Johnsson, A., Heldin, C.-H., Wasteson, A., Westermark, B., Deuel, T. F., Huang, J. S., Seeburg, P. H., Gray, A., Ullrich, A., Scrace, G., Stroobant, P. and Waterfield, M. D. (1984) *EMBO J.* **136**, 921-928.
- Kane, J. F. and Hartley, D. L. (1988) *TIBTECH* **6**, 95-101.
- Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsuka, E., Ikebara, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S. and Horikoshi, K. (1987) *Gene* **54**, 197-202.
- Kaytes, P. S., Theriault, N. Y., Poorman, R. A., Murakami, K. und Tomich, C.-S. C. (1986) *J. Biotechnology* **4**, 205-218.
- Kelly, J. D., Raines, E. W., Ross, R. and Murray, M. J. (1985) *EMBO J.* **4**, 3399-3405.
- Kishimoto, F., Gomi, H., Kanaoka, M., Nakatani, T., Ito, A., Katoh, T., Agui, H., Sumida, S. und Ogino, S. (1986) *Gene* **45**, 311-316.
- Klein, B. K., Hill, S. R., Devine, C. S., Rowold, E., Smith, C. E., Galosy, S. and Olins, P. O. (1991) *Biotechnology* **9**, 869-872.
- Kleid, D. G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D. M., Grubman, M. J., McKercher, P. D., Morgan, D. O., Robertson, B. H. and Bachrach, H. L. (1981) *Science*, **214**, 1125-1128.
- Kronheim, S. R., Cantrell, M. A., Deeley, M. C., March, C. J., Glackin, P. J., Anderson, D. M., Hemenway, T., Merriam, J. E., Cosman, D. und Hopp, T. P. (1986) *Biotechnology* **4**, 1078-1082.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Langley, K. E., Lai, P.-H., Wypych, J., Everett, R. R., Berg, T. F., Krabill, L. F., Davis, J. M. und Souza, L. M. (1987A) *Eur. J. Biochem.* **163**, 323-330.
- Langley, K. E., Berg, T. F., Strickland, T. W., Fenton, D. M., Boone, T. C. und Wypych, J. (1987B) *Eur. J. Biochem.* **163**, 313-321.
- Lee, J. M. and Ullrich, A. (1984) *Eur. Pat. Appl.* 0128733.

Lee, N., Zhang, S.-Q., Cozzitorto, J., Yang, J.-S. and Testa, D. (1987) Gene 58, 77-86.

Levi, S., Cesarini, G., Arosio, P., Lorenzetti, R., Soria, M., Sollazzo, M., Albertini, A. und Cortese, R. (1987) Gene 51, 269-274.

Lord, S. (1985) DNA 4, 33-38.

Mandecki, W., Powell, B. S., Mollison, K. W., Carter, G. W. und Fox, J. L. (1986) Gene 43, 131-138.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.

Marston, F. A. O. (1986) Biochem. J. 240, 1-12.

Marston, F. A. O., Lowe, P. A., Doel, M. T., Schoemaker, J. M., White, S. und Angal, S. (1984) Biotechnology 2, 800-804.

Martial, J. A., Hallewell, R. A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M. (1979) Science 205, 602-606.

Matoskova, B., Rorsman, F., Svensson, V. and Betsholtz, C. (1989), Mol. Cell. Biol. 9, 3148-3150.

McCarthy, J. E. G. (1991) Adv. Gene Technol. 2, 145-175.

McCarthy, J. E. G. and Gualerzi, C. (1990) Trends Genet. 6, 78-85.

McCarthy, J. E. G., Schairer, H. U. und Sebald, W. (1985) EMBO J. 4, 519-526.

Meyers, C. A., Johanson, K. O., Miles, L. M., McDevitt, P. J., Simon, P. L., Webb, R. L., Chen, M.-J., Holskin, B. P., Lillquist, J. S. und Young, P. R. (1987) J. Biol. Chem. 262, 11176-11181.

Miki, T., Yasukochi, T., Nagatani, H., Furuno, M., Orita, T., Yamada, H., Imoto, T. und Horiuchi, T. (1987) Protein Engineering 1, 327-332.

Moks, T., Abrahmsen, L., Österlöf, B., Josephson, S., Östling, M., Enfors, S.-O., Persson, I., Nilsson, B. and Uhlen, M. (1987) Bio/Technology 5, 379-382.

Mustoe, T. A., Purdy, J., Gramates, P., Deuel, T. F., Thomason, A. and Pierce, G. F. (1989) Am. J. Surg. 158, 345-350.

Nagahari, K., Kanaya, S., Munakata, K., Aoyagi, Y. and Mizushima, S. (1985) EMBO J. 4, 3589-3592.

Nagai, K. and Thogersen, H. C. (1984) Nature 309, 810-812.

- Nakamura, K. and Inouye, M. (1982) EMBO J. 6, 771-775.
- Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Presnell, S. R. and Benner, S. A. (1987) Eur. J. Biochem. 163, 67-71.
- Nicaud, J.-M., Mackman, N. and Holland, I. B. (1986) J. Biotechnol. 3, 255-270.
- Nilsson, B. and Abrahmsen, L. (1990) Methods Enzymol. 185, 144-161.
- Nister, M., Hammacher, A., Mellström, K., Siegbahn, A., Rönnstrang, L., Westermark, B. and Heldin, C.-H. (1988), Cell 52, 791-799.
- Obukowicz, M. G., Turner, M. A., Wong, E. Y. and Tacon, W. C. (1988) Mol. Gen. Genet. 215, 19-25.
- Östman, A., Rall, L., Hammacher, A., Wormstead, M. A., Coit, D., Valenzuela, P., Betsholtz, C., Westermark, B. and Heldin, C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16202-16208.
- Ohsuye, K., Nomura, M., Tanaka, S., Kubota, I., Nakazato, H., Shinagawa, H., Nakata, A. and Noguchi, T. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1283-1294.
- Oka, T., Sakamoto, S., Miyoshi, K.-I., Fuwa, T., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, G. and Miyake, T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216.
- Olins, P. O. and Rangwala, S. H. (1990) Methods Enzymol. 185, 115-119.
- Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A. und Goeddel, D. V. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6060-6064.
- Peters, M. A., Lau, E. P., Snitman, D. L., van Wyk, J. J., Underwood, L. E., Russell, W. E. and Svoboda, M. E. (1985) Gene 35, 83-89.
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G., Senior, R. M. and Deuel, T. F. (1989) J. Cell. Biol. 109, 429-440.
- Pierce, G. F., Vandenberg, J., Rudolph, R., Tarpley, J. and Mustoe, T. A. (1991A) Am. J. Pathol. 138, 629-646.
- Pierce, G. F., Brown, D. and Mustoe, T. A. (1991B) J. Lab. Clin. Med. 117, 373-382.
- Pollitt, S. and Zalkin, H. (1983) J. Bacteriol. 153, 27-32.
- Potts, J. T., Kronenberg, H. M. and Rosenblatt, M. (1982) Adv. Protein Chem. 35, 323-398.

- Ratner, L., Josephs, S. F., Jarrett, R., Reitz, M. S. and Wong-Staal, F. (1985), *Nucl. Acids Res.* **13**, 5007-5018.
- Reilly, C. F. and Broski, J. E. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 1047-1054.
- Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1981) *Gene* **15**, 81-93.
- Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 4677-4688.
- Robson, M. C., Phillips, L. G., Thomason, A., Altrock, B. W., Pence, P. C., Heggers, J. P., Johnston, A. F., M'Hugh, T. P., Anthony, M. S. Robson, L. E., Odom. L. L., Yanagihara, D. and Pierce, G. F. (1992) *Ann. Plast. Surg.* **29**, 193-201.
- Ross R., Glomset, J. A., Kariya, B. and Harker, L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1207-1210.
- Sachinidis, A., Locher, R., Vetter, W., Tatje, D. and Hoppe, J. (1990A) *J. Biol. Chem.* **265**, 10238-10243.
- Sachinidis, A., Locher, R., Hoppe, J. and Vetter, W. (1990B) *FEBS Lett.* **275**, 95-98.
- Saito, Y., Ishii, Y., Niwa, M. and Ueda, I. (1987) *J. Biochem.* **101**, 1281-1288.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sawyer, J. R. and Blattner, F. R. (1991) *Protein Engineering* **4**, 947-953.
- Schauder, B., Blöcker, H., Frank, R. and McCarthy, J. E. G. (1987) *Gene* **52**, 279-283.
- Schauder, B. and McCarthy, J. E. G. (1989) *Gene* **78**, 59-72.
- Schein, C. H. (1989) *Biotechnology* **7**, 1141-1149.
- Scherer, G. F. E., Walkinshaw, M. D., Arnott, S. and Morre, D. J. (1980) *Nucleic Acids Res.* **8**, 3895-3907.
- Schoner, B. E., Hsiung, H. M., Belagaje, R. M., Mayne, N. G. and Schoner, R. G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5403-5407.
- Seeburg, P. H., Shine, J., Martial, J. A., Ivarie, R. D., Morris, J. A., Ullrich, A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M. (1978) *Nature* **276**, 795-798.
- Shine, J., Fettes, I., Lan, N. C. Y., Roberts, J. L. and Baxter, J. D. (1980) *Nature* **285**, 456-461.

- Shipley, G. D., Childe, C. B., Volkenant, M. E. and Moses, H. L. (1984) *Cancer Res.* **44**, 710-716.
- Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermark, B. and Heldin, C.-H. (1990) *J. Clin. Invest.* **85**, 916-920.
- Simon, L. D., Randolph, B., Irwin, N. und Binkowski, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2059-2062.
- Simons, G., Remaut, E., Allet, B., Devos, R. und Fiers, W. (1984) *Gene* **28**, 55-64.
- Sollazzo, M., Frank, R. and Cesareni, G. (1985) *Gene* **37**, 199-206.
- Spanjaard, R. A., van Dijk, M. C. M., Turion, A. J. and van Duin, J. (1989) *Gene* **80**, 345-351.
- Stader, J. A. and Silhavy, T. J. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 166-187.
- Stanley, K. K. and Luzio, J. P. (1984) *EMBO J.* **3**, 1429-1434.
- Stanssens, G., Remaut, E. and Fiers, W. (1985) *Gene* **36**, 211-223.
- Stark, M. J. R. (1987) *Gene* **54**, 255-267.
- Strauch, K. L. and Beckwith, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1576-1580.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorf, J. W. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Swamy, K. H. S. and Goldberg, A. L. (1982) *J. Bacteriol.* **149**, 1027-1033.
- Szoka, P. R., Schreiber, A. B., Chan, H. and Murthy, J. (1986) *DNA* **5**, 11-20.
- Tabor, S. and Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1074-1078.
- Takagi, H., Morinaga, Y., Tsuchia, M., Ikemura, H. and Inouye, M. (1988) *Biotechnology* **6**, 948-950.
- Takahara, M., Sagai, H., Inouye, S. and Inouye, M. (1988) *Biotechnology*, **6**, 195-198.
- Talmadge, K., Kaufman, J. and Gilbert, W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3988-3992.
- Talmadge, K. and Gilbert, W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1830-1833.

- Taniguchi, T., Guarante, L., Roberts, T. M., Kimelman, D., Douhan III, J. und Ptashne, M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5230-5233.
- Tanizawa, Y., Kishi, F., Kaneko, T. und Nakazawa, A. (1987) J. Biochem. 101, 1289-1296.
- Tsuji, T., Nakagawa, R., Sugimoto, N. und Fukuhara, K.-I. (1987) Biochemistry 26, 3129-3134.
- Tuggle, C. K. und Fuchs, J. A. (1985) J. Bacteriol. 162, 448-450.
- Uhlen, M. and Moks, T. (1990) Methods Enzymol. 185, 129-143.
- Ullman, A. (1984) Gene, 29, 27-31.
- van der Werf, S., Dreano, M., Bruneau, P., Kopecka, H. and Girard, M. (1983) Gene 23, 85-93.
- Varadarajan, R., Szabo, A. and Boxer, S. G. (1985) Proc. Natl. Sci. USA 82, 5681-5684.
- Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L., Gilbert, W. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3727-3731.
- Wang, J. Y. J. and Williams, L. T. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10645-10648.
- Weich, H. A., Sebald, W., Schairer, H. U. and Hoppe, J. (1986), FEBS Lett. 198, 344-348.
- Wingender, E., Bercz, G., Blöcker, H., Frank, R. and Mayer, H. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4367-4373.
- Winkler, M. E., Blaber, M., Bennett, G. L., Holmes, W. und Verhar, G. A. (1985) Biotechnology 3, 990-998.
- Wise, R. J., Orkin, S. H. and Collins, T. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6591-6601.
- Wong, E. Y., Seetharam, R., Kotts, C. E., Heeren, R. A., Klein, B. K., Bradford, S. R., Mathis, K. J., Bishop, B. F., Siegel, N. R., Smith, C. E. and Tacon, W. C. (1988) Gene 68, 193-203.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Gene 33, 103-119.
- Yansura, D. G. (1990) Methods Enzymol. 185, 161-166.
- Yansura, D. G. and Henner, D. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 54-60.
- Young, R. M., Mendoza, A. E., Collins, T. and Orkin, S. H. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 6051-6054.

Zemel-Dreasen, O. und Zamir, A. (1984) Gene 27, 315-322.

Zuker, M. und Stiegler, P. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 133-148

Zurawski, S. M., Mosmann, T. R., Benedik, M. und Zurawski, G. (1986) J. Immunology 137, 3354-3360.

Abkürzungen:

bp	-	Basenpaar(e)
BSA	-	Rinderserumalbumin
C	-	Cistron
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	-	Immunglobulin der Klasse G
nt	-	Nukleotid(e)
p	-	Promotor
PBS	-	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	-	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
r	-	Gen für ein Repressormolekül
t	-	Transkriptions-Terminator
TIR	-	Translations-Initiations Region
TIS	-	Translation-Initiations Sequenz

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Beiersdorf AG
- (B) STRASSE: Unnastr. 48
- (C) ORT: Hamburg 20
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 2000 (20253)

- (A) NAME: GBF - Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
- (B) STRASSE: Mascheroder Weg 1
- (C) ORT: Braunschweig
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 3300

(ii) ANMELDETITEL: Multicistronische Expression rekombinanter Gene in Bakterienzellen.

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 919 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

- (B) BEMERKUNG: humane, verkürzte PDGF-B Vorläufersequenz, flankiert von 5'-BamHI und 3'-NcoI Restriktions-schnittstellen

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pMVW-2 (Weich et al., 1986)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..919
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "BamHI/NcoI-Fragment aus pMVW-2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 203..850
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "N-terminal verkürzte PDGF-B Vorläufersequenz"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 371..697
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Weich, H. A.
Sebald, W.
Schairer, H. U.
Hoppe, U.
- (C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.
- (D) BAND: 198
- (F) SEITEN: 344-348
- (G) DATUM: 1986

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGATCCACAG GACGGGTGTG GTCGCCATGA TCGCGTAGTC GATAGTGGCT CCAAGTAGCG	60
AAGGCCAGG ACTGGGCGGC GGCCAAAGCG GTCGGACAGT GCTCCGAGAA CGGGTGCGCA	120
TAGAAAATTGC ATCAACGCAT ATAGCGCTAG CAGCACGCCA TAGTGACTGG CGATGCTGTC	180
CCAATGGACG ATCCCCCCCCC CC CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAC	232
Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp	
-56 -55 -50	
CAC TCG ATC CGC TCC TTT GAT GAT CTC CAA CGC CTG CTG CAC GGA GAC	280
His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp	
-45 -40 -35	
CCC GGA GAG GAA GAT GGG GCC GAG TTG GAC CTG AAC ATG ACC CGC TCC	328
Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser	
-30 -25 -20 -15	
CAC TCT GGA GGC GAG CTG GAG AGC TTG GCT CGT GGA AGA AGG AGC CTG	376
His Ser Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu	
-10 -5 1	
GGT TCC CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG	424
Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr	
5 10 15	
CGC ACC GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC	472
Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn	
20 25 30	
GCC AAC TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC	520
Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser	
35 40 45 50	
GGC TGC TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG	568
Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln	
55 60 65	
CTG CGA CCT GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA	616
Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro	
70 75 80	
ATC TTT AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG	664
Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys	
85 90 95	
TGT GAG ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC CGA AGC CCG GGG GGT	712
Cys Glu Thr Val Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly	
100 105 110	

TCC CAG GAG CAG CGA GCC AAA ACG CCC CAA ACT CGG GTG ACC ATT CGG Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg 115 120 125 130	760
ACG GTG CGA GTC CGC CGG CCC AAG GGC AAG CAC CGG AAA TTC AAG Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys 135 140 145	808
CAC ACG CAT GAC AAG ACG GCA CTG AAG GAG ACC CTT GGA GCC His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala 150 155 160	850
TAGGGGCATC GGCAAGGAGAG TGTGTGGGCA GGGTTATTAA ATATGGTATT TGCTGTATTG	910
CCCCCATGG	919

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 216 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe -56 -55 -50 -45
Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly -40 -35 -30 -25
Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu -20 -15 -10
Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala -5 1 5
Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu 10 15 20
Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp 25 30 35 40
Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg 45 50 55
Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val 60 65 70
Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr 75 80 85
Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala 90 95 100
Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala 105 110 115 120
Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg 125 130 135

Pro Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr
140 145 150

Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala
155 160

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 748 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

- (B) BEMERKUNG: humanes PDGF-A Gen (kurze Spliceform, Hoppe et al., 1987) aus pODA, flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII Restriktionsschnittstellen

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pODA (Eichner et al., 1989)

(ix) MERkmale:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 95..682
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-A Vorläufersequenz (kurze Spliceform)"

(ix) MERkmale:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 353..682
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Eichner, W.
Jaeger, V.
Herbst, D.
Hauser, H.
Hoppe, J.
- (C) ZEITSCHRIFT: Eur. J. Biochem.
- (D) BAND: 185
- (F) SEITEN: 135-140
- (G) DATUM: 1989

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Hoppe, J.
Schumacher, L.
Eichner, W.
Weich, H. A.
- (C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.
- (D) BAND: 223
- (F) SEITEN: 243-246
- (G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

GAATTCCAC TGAATTCGC CGCCACAGGA GACCGGCTGG AGCGCCCCC CCGCGCCTCG	60
CCTCTCCTCC GAGCAGGCCAG CGCCTGGGA CGCG ATG AGG ACC TTG GCT TGC Met Arg Thr Leu Ala Cys -86 -85	112
CTG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTT CTG GCC GAG GAA Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu Glu -80 -75 -70 -65	160
GCC GAG ATC CCC CGC GAG GTG ATC GAG AGG CTG GCC CGC AGT CAG ATC Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile -60 -55 -50	208
CAC AGC ATC CGG GAC CTC CAG CGA CTC CTG GAG ATA GAC TCC GTA GGG His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly -45 -40 -35	256
AGT GAG GAT TCT TTG GAC ACC AGC CTG AGA GCT CAC GGG GTC CAC GCC Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His Ala -30 -25 -20	304
ACT AAG CAT GTG CCC GAG AAG CGG CCC CTG CCC ATT CGG AGG AAG AGA Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys Arg -15 -10 -5	352
AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG ACC AGG ACG GTC ATT Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile 1 5 10 15	400
TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG TCC GCC AAC TTC CTG Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu 20 25 30	448
ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC ACC GGC TGC TGC AAC Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn 35 40 45	496
ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC CAC CAC CGC AGC GTC Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val 50 55 60	544
AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG AAG CCA AAA TTA AAA GAA Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu 65 70 75 80	592
GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC GCC TGC GCG ACC ACA Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr 85 90 95	640
AGC CTG AAT CCG GAT TAT CGG GAA GAG GAC ACG GAT GTG AGG Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg 100 105 110	682
TGAGGATGAG CGCGAGCCCT TTCTGGGAC ATGGATGTGG GGATCCGTCG ACCTGCAGCC	742
AAGCTT	748

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 196 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
-86 -85 -80 -75

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
-70 -65 -60 -55

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
-50 -45 -40

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
-35 -30 -25

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
-20 -15 -10

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
-5 1 5 10

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
15 20 25

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
30 35 40

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
45 50 55

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
60 65 70

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
75 80 85 90

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
95 100 105

Thr Asp Val Arg
110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basen
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

- (A) BEZEICHNUNG: NCCLSA1
- (B) BEMERKUNG: synthetischer Linker zur Umklonierung des PDGF-B Gens aus pMW-2 in den Bakteriophagen M13mp19

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CATGGCCCAA TCGATCCCG

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basen
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

- (A) BEZEICHNUNG: NCCLSA2
- (B) BEMERKUNG: synthetischer Linker zur Umklonierung des PDGF-B Gens aus pMW-2 in den Bakteriophagen M13mp19

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TCGACGGGAT CGATTGGGC

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basen
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

- (A) BEZEICHNUNG: PDGBNDE
- (B) BEMERKUNG: Mutagenesepimer zur Einführung eines ATG-Codons und einer NdeI-Schnittstelle in den 5'-Bereich der maturen PDGF-B Kette

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GCTTGGCTCG TGGACATATG AGCCTGGGTT CCC

33

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basen
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

- (A) BEZEICHNUNG: PDGBTGA
- (B) BEMERKUNG: Mutagenesepimer zur Einführung eines Stop-Codons an das 3'-Ende der mATUREn PDGF-B Kette

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GCACGGCCTG TGACCTGATG ACCGGGGGGT TCCCAGG

37

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basen
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

- (A) BEZEICHNUNG: PDGANDE
- (B) BEMERKUNG: Mutagenesepimer zur Einführung einer NdeI-Schnittstelle in den 5'-Bereich der mATUREn PDGF-A Kette

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GCTTCCTCGA TGCTCATATG CCTCCGAATG GGC

33

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

- (B) BEMERKUNG: humanes PDGF-B Gen nach Einführung eines ATG-Codons und einer NdeI-Schnittstelle in den 5'-Bereich sowie eines Stop-Codons in den 3'-Bereich der mATUREn PDGF-B Kette

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: M13/PDGFB

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 18..347
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCTTGGCTCG TGGACAT ATG AGC CTG GGT TCC CTG ACC ATT GCT GAG CCG Met Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro	50
1 5 10	
GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG CGC ACC GAG GTG TTC GAG ATC TCC Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser	98
15 20 25	
CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC TTC CTG GTG TGG CCG CCC Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro	146
30 35 40	
TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC TGC AAC AAC CGC AAC GTG Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val	194
45 50 55	
CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA CCT GTC CAG GTG AGA AAG Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys	242
60 65 70 75	
ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC TTT AAG AAG GCC ACG GTG ACG Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr	290
80 85 90	
CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG TGT GAG ACA GTG GCA GCT GCA CGG Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg	338
95 100 105	
CCT GTG ACC TGATGACCGGG GGGGTTCCCCA GG Pro Val Thr	369

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 110 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
1 5 10 15

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
20 25 30

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
35 40 45

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
50 55 60

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
65 70 75 80

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
85 90 95

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr
100 105 110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 352 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(B) BEMERKUNG: humanes PDGF-A Gen nach Einführung eines ATG-Codons und einer NdeI-Schnittstelle in den 5'-Bereich sowie eines Stop-Codons in den 3'-Bereich der mATUREN PDGF-A Kette

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pCYT-A-2

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 17..349
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette
(kurze Spliceform)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GCCCCATTCCGG AGGCAT ATG AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG Met Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys	52
1 5 10	
ACC AGG ACG GTC ATT TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr	100
15 20 25	
TCC GCC AAC TTC CTG ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys	148
30 35 40	
ACC GGC TGC TGC AAC ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val	196
45 50 55 60	
CAC CAC CGC AGC GTC AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG AAG His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys	244
65 70 75	
CCA AAA TTA AAA GAA GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC Pro Lys Leu Lys Glu Val Gin Val Arg Leu Glu His Leu Glu Cys	292
80 85 90	
GCC TGC GCG ACC ACA AGC CTG AAT CCG GAT TAT CCG GAA GAG GAC ACG Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr	340
95 100 105	
GAT GTG AGG TGA Asp Val Arg	352
110	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val 1 5 10 15	
Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe 20 25 30	
Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys 35 40 45	
Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser 50 55 60	
Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys 65 70 75 80	

Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr
85 90 95

Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg
100 105 110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 58 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA
(A) BEZEICHNUNG: TIS E Sequenz
(B) BEMERKUNG: flankiert von 5' XhoI und 3' NdeI Restriktions-schnittstellen

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTCGAGTAAT TTACCAACAC TACTACGTTT TAACTGAAAC AAACTGGAGA CTCATATG

58

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA
(A) BEZEICHNUNG: TIS B Sequenz
(B) BEMERKUNG: flankiert von 5' SpeI und 3' NdeI Restriktions-schnittstellen

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

ACTAGAAAAA AGAAAGGAGG TGATCAAAAC ATATG

35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 1552 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Doppel
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS:
(A) BEZEICHNUNG: Expressionskassette des pCYTEX P3 Vektors
(B) BEMERKUNG: 5' und 3' flankiert von pUC18 Nukleotidsequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CATATAGCGG CCGCAGGTGA TGATTATCAG CCAGCAGAGA ATTAAGGAAA ACAGACAGGT	60
TTATTGAGCG CTTATCTTTC CCTTTATTT TGCTGGGTA AGTCGCATAA AAACCATTCT	120
TCATAATTCA ATCCATTAC TATGTTATGT TCTGAGGGGA GTGAAAATTC CCCTAATTG	180
ATGAAGATTG TTGCTCAATT GTTATCAGCT ATGCGCCGAC CAGAACACCT TGCGATCAG	240
CCAAACGTCT CTTCAAGGCCA CTGACTAGCG ATAACCTTCC CCACAACGGA ACAACTCTCA	300
TTGCATGGGA TCATTGGGTA CTGTGGGTTT AGTGGTTGTA AAAACACCTG ACCGCTATCC	360
CTGATCAGTT TCTTGAAAGGT AAAACTCATCA CCCCCAAGTC TGGCTATGCA GAAATCACCT	420
GGCTCAACAG CCTGCTCAGG GTCAACGAGA ATTAACATTC CGTCAGGAAA GCTTGGCTTG	480
GAGCCTGTTG GTGCGGTCA GGAATTACCT TCAACCTCAA GCCAGAATGC AGAATCACTG	540
GCTTTTTGG TTGTGCTTAC CCATCTCTCC GCATCACCTT TGGTAAAGGT TCTAAGCTTA	600
GGTGAGAACAA TCCCTGCCTG AACATGAGAA AAAACAGGGT ACTCATACTC ACTTCTAAGT	660
GACGGCTGCA TACTAACCGC TTCATACATC TCGTAGATTT CTCTGGCGAT TGAAGGGCTA	720
AATTCTTCAA CGCTAACTTT GAGAATTTTT GTAAGCAATG CGGCGTTATA AGCATTAAAT	780
GCATTGATGC CATTAAATAA AGCACCAACG CCTGACTGCC CCATCCCCAT CTTGTCTGCG	840
ACAGATTCCCT GGGATAAGGCC AAGTTCATTT TTCTTTTTT CATAAATTGC TTTAAGGCGA	900
CGTGGTGCCT CAAGCTGCTC TTGTGTTAAT GGTTCTTTT TTGTGCTCAT ACGTAAATC	960
TATCACCGCA AGGGATAAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATGGTAC CCGGGGATCG	1020
ATCCCCTCCTT AAATCTATCA CCGCAAGGGA TAAATATCTA ACACCGTGCG TGTGACTAT	1080
TTTACCTCTG GCGGTGATAA TGGTGCATA GATCTACTAG TAAAAAGAAA GGAGGTGATC	1140
AAAACATATG TCTAGAGGAT CCGTCGACTC TAGAGGATCT AAAGTTTGT CGTCTTCCA	1200
GACGTTAGTA AATGAATTTC CTGTATGAGG TTTGCTAAA CAACTTCAA CAGTTTCAGC	1260
GGAGTGAGAA TAGAAAGGAA CAACTAAAGG AATTGCGAAT AATAATTTC TCACGTTGAA	1320
AATCTCCAAA AAAAAAGGCT CCAAAAGGAG CCTTTAATTG TATCGGTTA TCAGCTTGCT	1380
TTCGAGGTGA ATTTCTTAAA CAGCTTGATA CCGATAGTTG CGCCGACAAT GACAACAACC	1440
ATCGCCCCACG CATAACCGAT ATATTGGTC GCTGAGGCTT GCAGGGAGTC AAAGGCGCTT	1500
TTGCGGGATC TCGTCGAAGG CGCGGGGGCG CGGACGCCGC CGGGTTCCCC TG	1552

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur rekombinanten Herstellung multimerer Proteine in Bakterienzellen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Zellen mit einem Vektor transformiert, der eine multicistronische Expressionseinheit der allgemeinen Formel

$$p - (TIS - C)_n$$

enthält, in der

"p" ein bakterieller transkriptionaler Promotor und

"(TIS - C)_n" repetitive Gruppen sind, innerhalb derer

"C" jeweils für eine Untereinheit oder eine Komponente eines multimeren Proteins kodierende DNA-Sequenzen sind, die keine für ein Signalpeptid kodierende Region umfassen, wobei die Sequenzen "C" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS - C" untereinander gleich und/oder verschieden sein können,

"TIS" synthetische und/oder natürliche bakterielle nicht translatierte "leader" Sequenzen sind, die jeweils mit "C" eine chimäre "TIR" bilden, wobei die Sequenzen "TIS" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS - C" untereinander gleich und/oder verschieden sein können, und

n eine natürliche Zahl ≥ 2 ist,

wobei "p", "TIS" und "C" jeweils operativ miteinander verknüpft sind und die Expressionsrate der Protein-kodierenden Sequenzen "C" durch Auswahl der jeweils zugehörigen Sequenz "TIS" individuell gesteuert wird,

- b) die transformierten Zellen in einem geeigneten Nährmedium kultiviert und anschließend
 - c) die Zellen von dem Medium abtrennt, die Expressionsprodukte der Sequenzen "C" aus dem Cytoplasma der Zellen isoliert, gegebenenfalls renaturiert und zu dem funktionellen multimeren Protein rekonstituiert.
2. Multicistronische Expressionseinheit zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

$$p - (TIS - C)_n,$$

in der

"p" ein bakterieller transkriptionaler Promotor und
"(TIS - C)_n" repetitive Gruppen sind, innerhalb derer
"C" jeweils für eine Untereinheit oder eine Komponente eines multimeren Proteins kodierende DNA-Sequenzen sind, die keine für ein Signalpeptid kodierende Region umfassen, wobei die Sequenzen "C" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS - C" untereinander gleich und/oder verschieden sein können,

"TIS" synthetische und/oder natürliche bakterielle nicht translatierte "leader" Sequenzen sind, die jeweils mit "C" eine chimäre "TIR" bilden, wobei die Sequenzen "TIS" der aufeinander folgenden Gruppen "TIS

- "C" untereinander gleich und/oder verschieden sein können, und

n eine natürliche Zahl ≥ 2 ist,

wobei "p", "TIS" und "C" jeweils operativ miteinander verknüpft sind.

3. Multicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß "n" 2 oder 3 ist.
4. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie an ihrem 3' Ende operativ mit einem bakteriellen Transkriptions-Terminator verknüpft ist.
5. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie operativ an ein Gen "r" mit eigenem Promotor gekoppelt ist, welches für ein Repressormolekül für den Promotor "p" kodiert.
6. Multicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß "p" der λP_R -Promotor oder der λP_L -Promotor und "r" das cI857-Gen für den temperatursensitiven λ -Repressor ist.
7. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß "TIS" die Sequenz TIS B gemäß SEQ. ID. NO: 15 und/oder TIS E gemäß SEQ. ID. NO: 14 ist.
8. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen "C" für die verschiedenen Komponenten oder Untereinheiten von VEGF, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie, Bone Morphogenic Protein (BMP), Faktoren der Integrin/Cadherin Familie, Histokompatibilitätsantigenen, Häm-

globin, T-Zellrezeptoren oder des AB-Heterodimeren des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) oder deren natürliche oder synthetische Varianten kodieren.

9. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß "n" 2 ist und die Sequenzen "C" der beiden repetitiven Einheiten "(TIS - C)₂" alternativ ein für die A- oder die B-Kette von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodieren, wobei beide Sequenzen gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.
10. Multicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine der Sequenzen "C" die PDGF-A_K Sequenz (SEQ. ID. NO:12) oder die PDGF-A_L Sequenz ist, welche für die reife PDGF-A-Kette kodiert.
11. Multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die jeweils andere Sequenz "C" die vollständige PDGF-B Sequenz (SEQ. ID. NO: 10) ist, welche für die reife PDGF-B-Kette (SEQ. ID. NO: 11) kodiert, oder das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder Varianten dieser Sequenzen ist.
12. Vektor zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 1, welcher eine multicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 2 bis 11 enthält.
13. Wirtszelle zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 1, welche eine Bakterienzelle transformiert mit einem Vektor nach Anspruch 12 ist.
14. Wirtszelle nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine *E. coli*-Zelle ist.
15. Bicistronische Expressionseinheit für die simultane und direkte Expression für PDGF-A und PDGF-B kodierender DNA-

Sequenzen in einer Bakterienzelle, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

$$p - TIS_1 - C_1 - TIS_2 - C_2 - t - r,$$

in der

"p" der λP_R -Promotor ist,

"C₁" und "C₂" alternativ Sequenzen enthalten, die für PDGF-A oder PDGF-B kodieren und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit enthalten sind,

TIS₁ und TIS₂ jeweils die Sequenz TIS B (SEQ. ID. NO: 15) oder TIS E (SEQ. ID. NO: 14) sind und untereinander gleich oder verschieden sein können,

"t" der Terminator des Bakteriophagen fd ist und

"r" das cI857-Gen für den temperatursensitiven λ -Repressor ist.

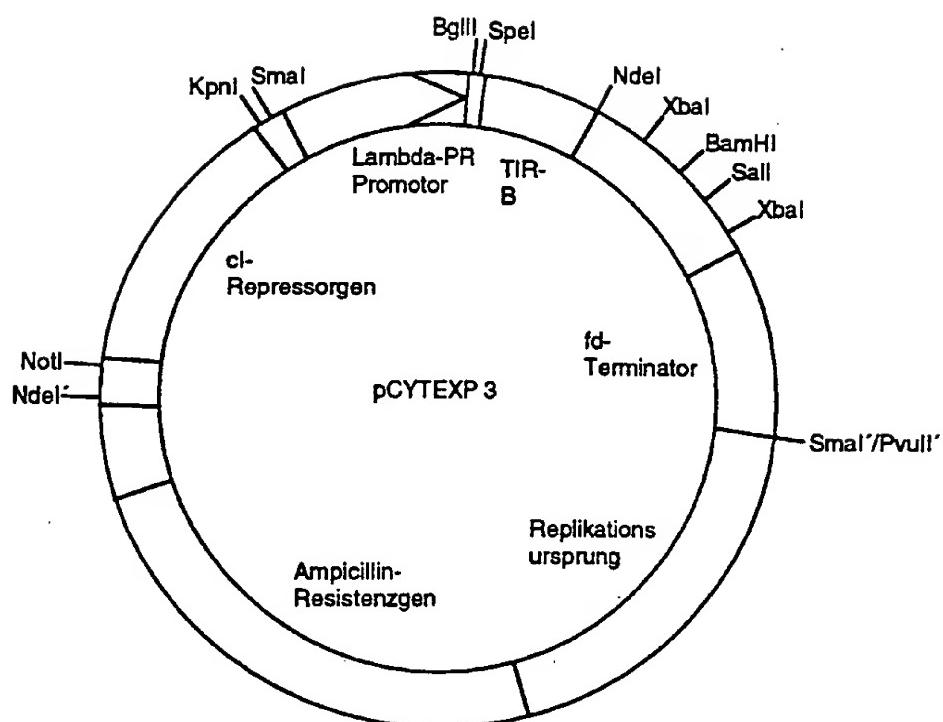
16. Bicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß C₁ und C₂ alternativ die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 oder die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 enthalten und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit enthalten sind.
17. Bicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß "TIS₁" die TIS B Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 15, "TIS₂" die TIS E Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 14, "C₁" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 und "C₂" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 sind.
18. Bicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß "TIS₁" und "TIS₂" die TIS B Sequenzen gemäß SEQ. ID. NO: 15, "C₁" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ.

ID. NO: 10 und "C₂" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 sind.

19. Bicistronische Expressionseinheit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß "TIS₁" und "TIS₂" die TIS B Sequenzen gemäß SEQ. ID. NO: 15 sind, "C₁" die PDGF-A-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 12 und "C₂" die PDGF-B-Sequenz gemäß SEQ. ID. NO: 10 sind.
20. Rekombinanter Vektor zur Expression in Bakterienzellen, welcher eine bicistronische Expressionseinheit nach den Ansprüchen 15 bis 19 enthält.
21. Wirtszelle, welche eine Bakterienzelle transformiert mit einem Vektor nach Anspruch 20 ist.
22. Wirtszelle nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine *E. coli*-Zelle ist.
23. Wirtszelle nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine *E. coli*-Zelle ist, welche von den Klonen TG2/pBS/PDGF-BA2 (Hinterlegungsnummer DSM 8336), TG2/pBS/PDGF-BA4 (Hinterlegungsnummer DSM 8338) oder TG2/pBS/PDGF-AB4 (Hinterlegungsnummer DSM 8337) abstammt.
24. Verfahren zur rekombinanten Herstellung von PDGF-AB in Bakterienzellen, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen nach den Ansprüchen 21 bis 23 in einem geeigneten Medium kultiviert, anschließend die Zellen von dem Medium abtrennt, die Proteinkomponenten PDGF-A und PDGF-B aus dem Cytoplasma der Zellen isoliert, renaturiert und zu funktionellem PDGF-AB rekonstituiert.
25. Verwendung der heteromeren Proteine hergestellt nach den Ansprüchen 1 oder 24 zur Herstellung von pharmazeutischen oder kosmetischen Präparaten.

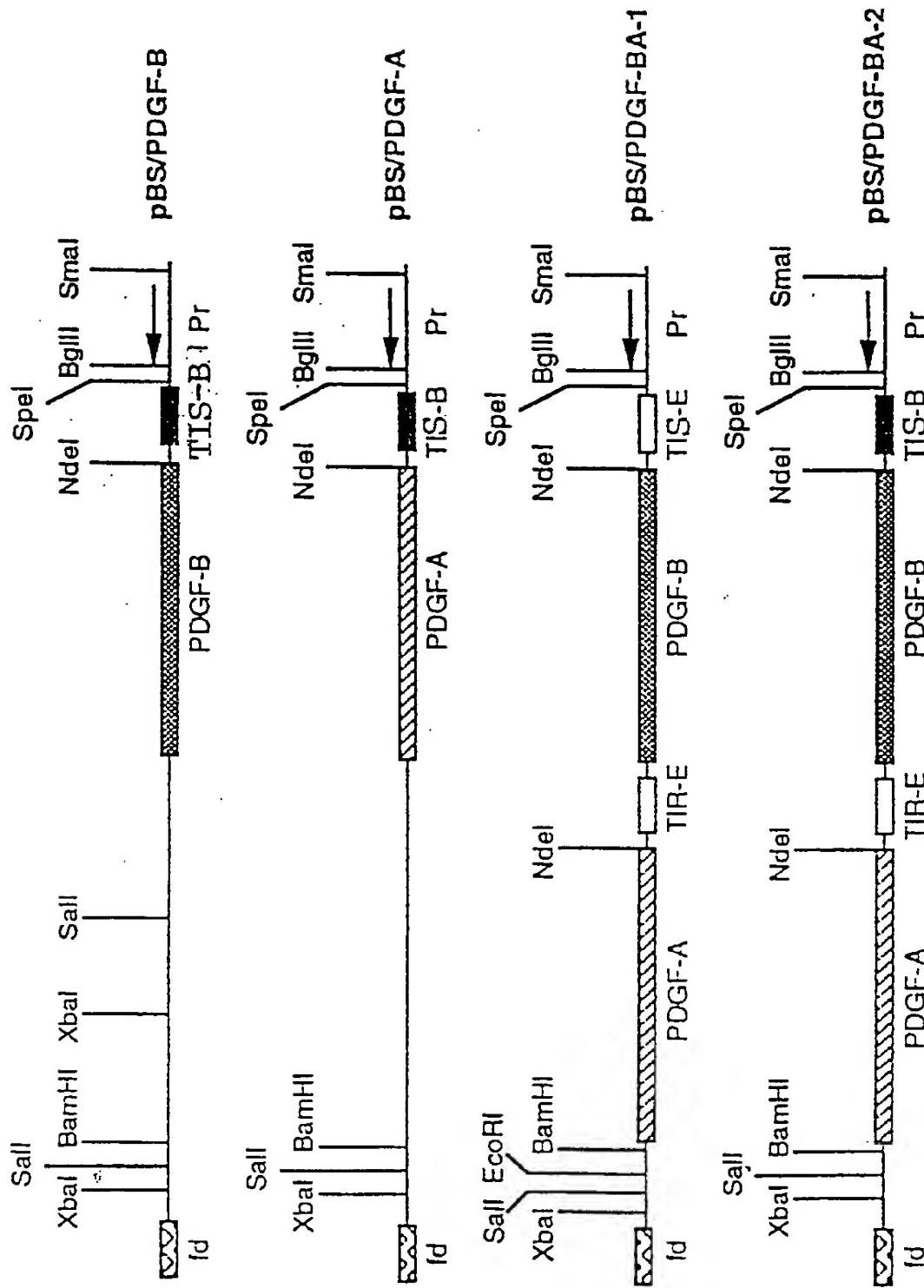
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das heteromere Protein PDGF-AB ist.
27. Verwendung nach den Ansprüchen 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Präparat eine Salbe, ein Spray, ein Gel, ein Wundverband, ein Pflaster oder eine Wundauflage ist.

1/8

FIGUR 1

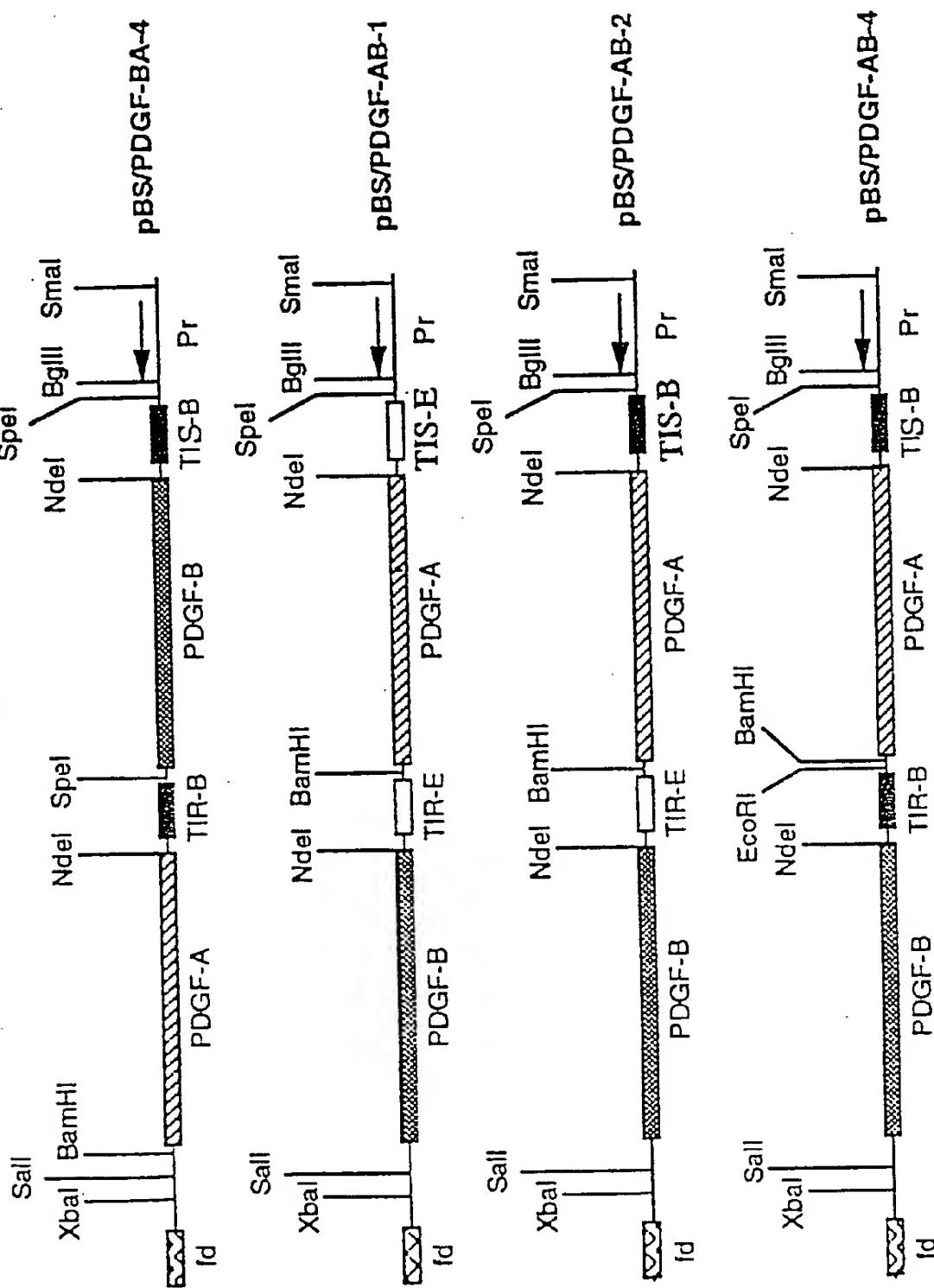
2/8

FIGUR 2-1

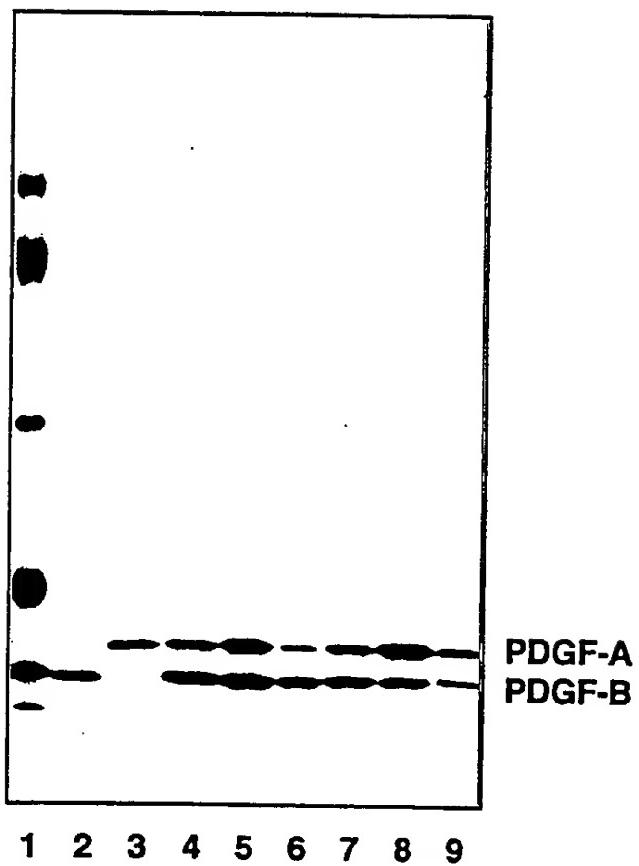


3/8

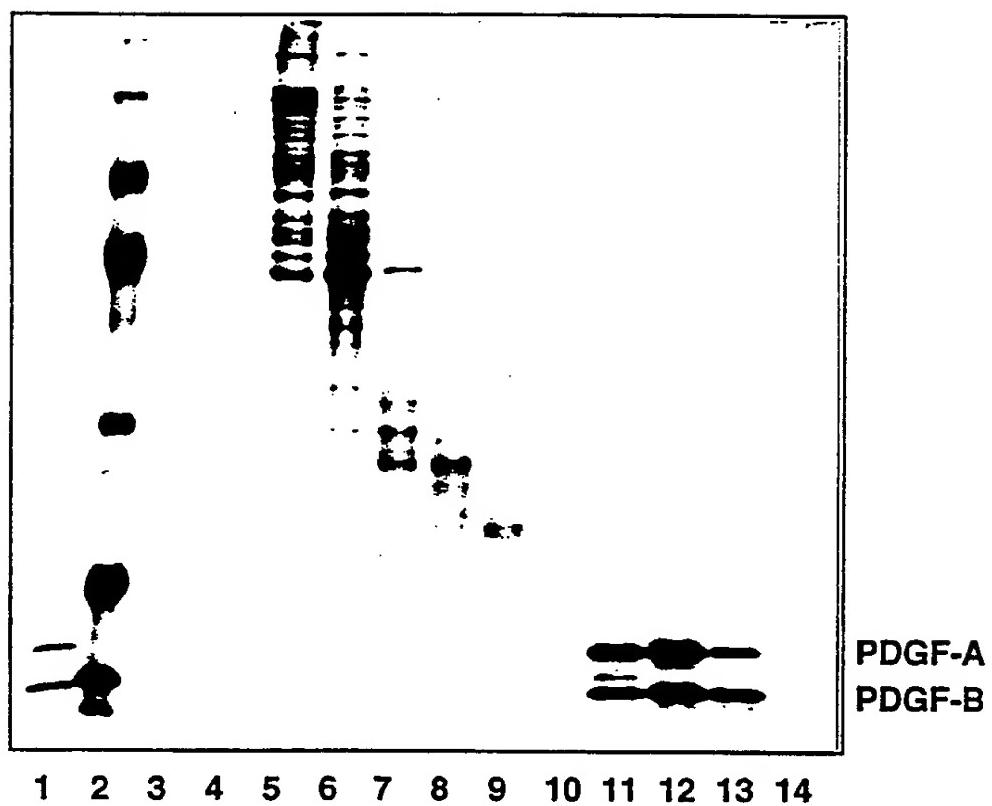
FIGUR 2-2



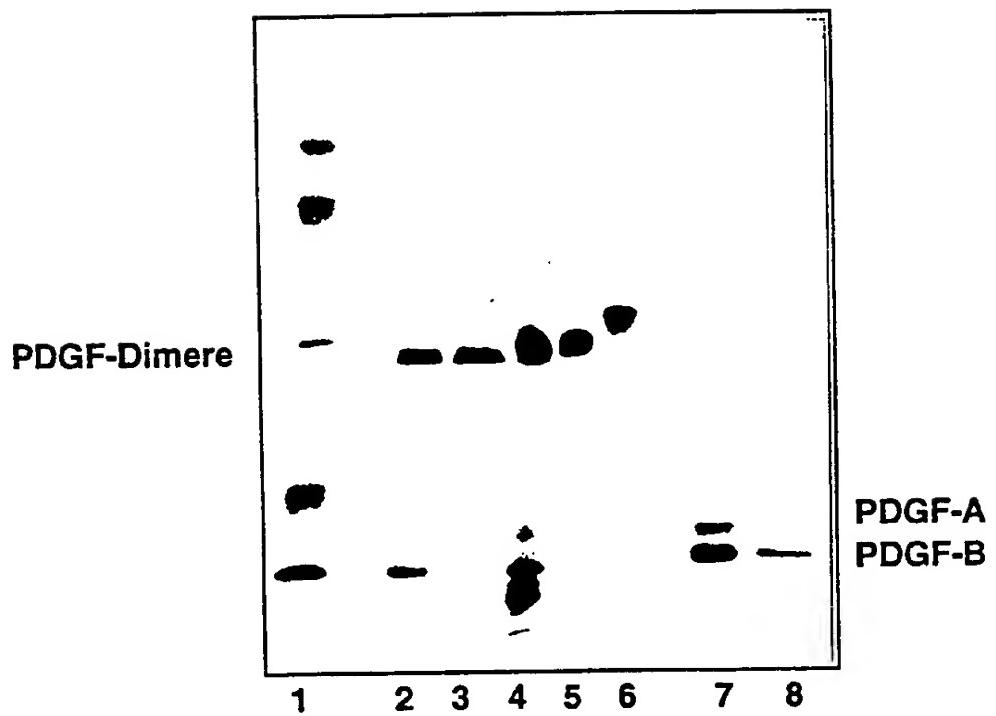
4/8

FIGUR 3

5/8

FIGUR 4

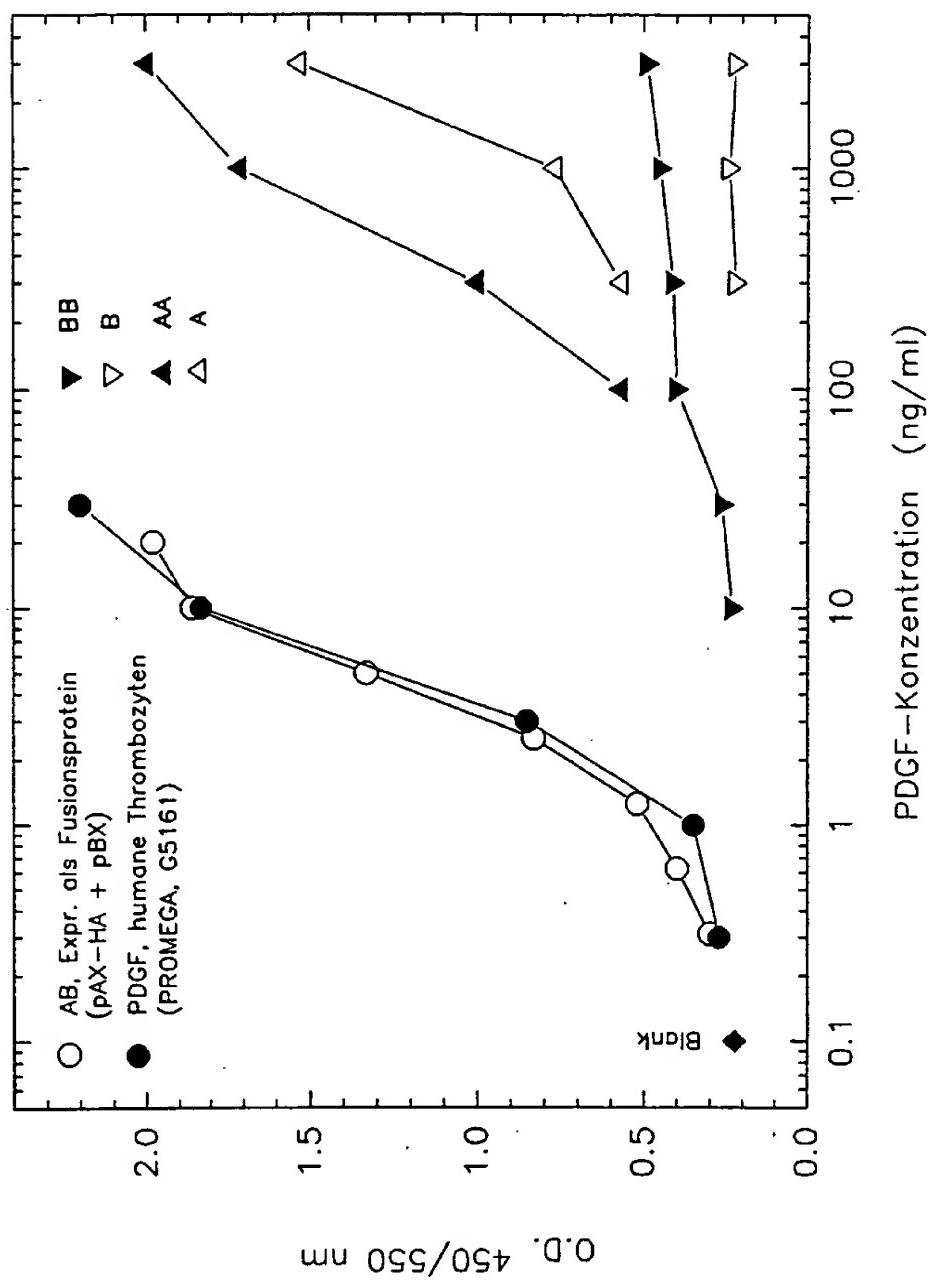
6/8

FIGUR 5

7/8

FIGUR 6

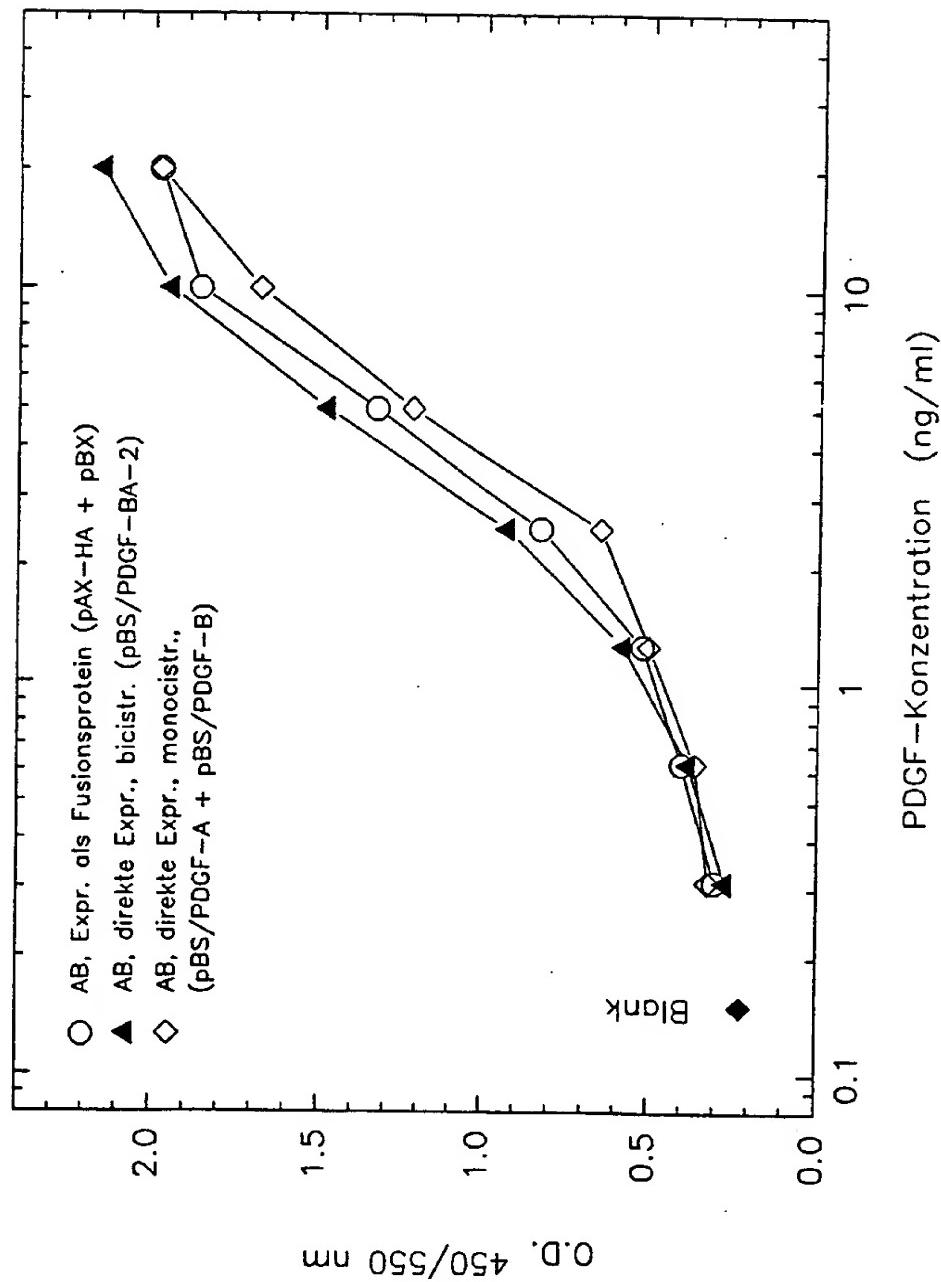
PDGF-AB - ELISA



FIGUR 7

PDGF-AB - ELISA

8/8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/01861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 5	C12N15/70	C12N15/63	C12N15/12	C12P21/02
	C12N1/21			A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 288 307 (CHIRON CORPORATION) 26 October 1988 * siehe Seite 5, Zeilen 29-34 * ---	25-27
Y	GB,A,2 214 508 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 6 September 1989 * siehe Example 4 * ---	1-16, 20-22,24
Y	EMBO JOURNAL vol. 4, no. 2 , February 1985 pages 519 - 526 MCCARTHY, J.E.G. ET AL. 'Translational initiation frequency of atp genes from Escherichia coli: identification of an intercistronic sequence that enhances translation' cited in the application * siehe Figures 3 and 4; Table 1 * --- -/-	1-16, 20-22,24

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

5 October 1994

Date of mailing of the international search report

27.10.1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Alt, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/01861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ADV. GENE TECHNOL. vol. 2 , 1991 pages 145 - 175 MCCARTHY, J.E.G. 'Optimizing post-translational steps of gene expression in Escherichia coli' cited in the application *siehe Table 2; Kapitel 3.1 * ---	1-16, 20-22,24
A	TRENDS GENET. vol. 6, no. 3 , 1990 pages 78 - 85 MCCARTHY, J.E.G. AND GUALERZI, C. 'Translational control of prokaryotic expression' cited in the application ---	
A	DATABASE BIOSIS NR. 87081756 KRAVCHENKO, V.V. ET AL. 'Translation efficiency of distal gene polycistronic messenger RNA depends on mutual arrangement of regulatory signals of template' see abstract & BIOORG. KHIM. vol. 14, no. 10 , 1988 pages 1372 - 1386 KRAVCHENKO, V.V. ET AL. ---	
P,X	GENE vol. 143 , 1994 pages 201 - 209 SCHNEPPE, B. ET AL. 'Translational regulation of a recombinant operon containing human platelet-derived growth factor (PDGF)-encoding genes in Escherichia coli: genetic titration of the peptide chains of the heterodimer AB' * insgesamt * -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/01861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0288307	26-10-88	JP-A- 1098489 US-A- 5219759	17-04-89 15-06-93
GB-A-2214508	06-09-89	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01861

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 5 C12N15/70 C12N15/63 C12N15/12 C12P21/02 A61K37/02
 C12N1/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 5 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Ber. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 288 307 (CHIRON CORPORATION) 26. Oktober 1988 * siehe Seite 5, Zeilen 29-34 * ---	25-27
Y	GB,A,2 214 508 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 6. September 1989 * siehe Example 4 * ---	1-16, 20-22,24
Y	EMBO JOURNAL Bd. 4, Nr. 2, Februar 1985 Seiten 519 - 526 MCCARTHY, J.E.G. ET AL. 'Translational initiation frequency of atp genes from Escherichia coli: identification of an intercistronic sequence that enhances translation' in der Anmeldung erwähnt * siehe Figures 3 and 4; Table 1 * ---	1-16, 20-22,24

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. Oktober 1994	27-10-1994

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Alt, G
--	---

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inventarionales Aktenzeichen PCT/EP 94/01861

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ADV. GENE TECHNOL. Bd. 2 , 1991 Seiten 145 - 175 MCCARTHY, J.E.G. 'Optimizing post-translational steps of gene expression in Escherichia coli' in der Anmeldung erwähnt *siehe Table 2; Kapitel 3.1 * ---	1-16, 20-22,24
A	TRENDS GENET. Bd. 6, Nr. 3 , 1990 Seiten 78 - 85 MCCARTHY, J.E.G. AND GUALERZI, C. 'Translational control of prokaryotic expression' in der Anmeldung erwähnt ---	
A	DATABASE BIOSIS NR. 87081756 KRAVCHENKO, V.V. ET AL. 'Translation efficiency of distal gene polycistronic messenger RNA depends on mutual arrangement of regulatory signals of template' siehe Zusammenfassung & BIOORG. KHIM. Bd. 14, Nr. 10 , 1988 Seiten 1372 - 1386 KRAVCHENKO, V.V. ET AL. ---	
P,X	GENE Bd. 143 , 1994 Seiten 201 - 209 SCHNEPPE, B. ET AL. 'Translational regulation of a recombinant operon containing human platelet-derived growth factor (PDGF)-encoding genes in Escherichia coli: genetic titration of the peptide chains of the heterodimer AB' * insgesamt * -----	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01861

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0288307	26-10-88	JP-A-	1098489	17-04-89
		US-A-	5219759	15-06-93
GB-A-2214508	06-09-89	KEINE		